

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DOS GENES KIR E HLA EM
PACIENTES COM VITILIGO**

Vanessa Guterres Dias

Orientação: Prof. Dr. Rafael Roesler

Dissertação de Mestrado

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DOS GENES KIR E HLA EM PACIENTES COM VITILIGO

Vanessa Guterres Dias

Orientação: Prof. Dr. Rafael Roesler

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2014

Dedico este trabalho à minha família, em especial aos meus pais Valdoir e Marisa, pelo incentivo, carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Rafael Roesler, pela sua orientação.

Ao professor Luiz Fernando Jobim, por acreditar em meu trabalho.

À Dra. Mariana Jobim, que desde o início confiou e me incentivou nesta pesquisa.

Ao professor Gilberto Schwartzmann, pelo incentivo.

À amiga Pâmela Portela, pela dedicação, compreensão e apoio durante todo o processo desta pesquisa.

À Patrícia Salim, pelo auxílio nas análises estatísticas.

À amiga Joice Merzoni, pelo incentivo e apoio prático.

À Dra. Tânia Cestari, pela possibilidade de trabalhar com seus pacientes.

A todos os colegas do Serviço de Imunologia, pela compreensão e auxílio.

Aos colegas do Serviço de Dermatologia, pela captação de pacientes.

Aos pacientes, que confiaram em meu trabalho e apostaram nesta pesquisa.

Aos meus pais, pelo apoio e carinho.

Ao PPG - Ciências Médicas, pela oportunidade de realizar este estudo.

Ao FIPE-HCPA e CAPES, pelo auxílio financeiro.

FONTES FINANCIADORAS

O trabalho teve apoio das seguintes agências: Conselho Nacional Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE- HCPA), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM).

RESUMO

O vitiligo é uma doença dermatológica de causa desconhecida. O aparecimento se dá através de manchas branco-nacaradas na pele, ocorridas pela morte ou redução na funcionalidade das células epidérmicas, os melanócitos, que produzem a melanina, pigmento cutâneo. As células *Natural Killer (NK)* fazem parte do sistema imune inato e através de seus receptores KIR (*Killer immunoglobulin-like-receptors*) reconhecem moléculas de HLA (*Human leukocyte antigen*) classe I presentes nas células. Quando não há o reconhecimento do HLA classe I, como em células tumorais ou infectadas por vírus, a célula NK induz a morte da célula alvo. Uma das teorias para essa doença é a imunológica, a qual admite que o vitiligo seja doença autoimune pela formação de anticorpos antimelanócitos, podendo ser associado a outras doenças autoimunes. O objetivo deste estudo foi investigar polimorfismos dos genes KIR e HLA e sua associação com pacientes com vitiligo comparando com um grupo controle. Foram genotipados 112 pacientes com diagnóstico de vitiligo e 250 indivíduos saudáveis para 16 genes KIR e seus ligantes HLA por PCR-SSO e PCR-SSP respectivamente. Nossos resultados mostraram um fator de risco para a doença na interação do gene ativador KIR2DS1 com o seu ligante C2 ($P=0,015$; OR: 2,06). Também houve uma associação significativa do gene ativador KIR2DS1 com o ligante heterozigoto C1/C2 ($P=0,025$; OR: 2,26). A interação KIR2DS1/C2 está presente em 52,8% dos pacientes com vitiligo e em 35,2% do grupo controle, já a interação KIR2DS1/C1/C2 está presente em 54,7% dos pacientes com vitiligo e 34,9% do grupo controle. Nossos resultados sugerem um possível fator de risco do gene ativador KIR2DS1 com o seu ligante C2, sendo essa combinação uma possível susceptibilidade à doença.

Palavras-Chaves : HLA, genes KIR, Vitiligo, células NK.

ABSTRACT

Vitiligo is a skin disease of unknown cause. The main symptom of vitiligo is white patches on the skin. Which are caused by destruction of pigment-forming cells (melanocytes). Natural killer (NK) cells are part of the innate immune system and they recognize class I HLA molecules (human leukocyte antigen) through their KIR receptors (killer-cell immunoglobulin-like-receptors). When class I HLA molecules are not recognized, e.g.: tumour cells or virus-infected cells, NK cells induce the death of target cells. One of the possible aetiologies for this disease is the immune cause. According to this theory, vitiligo is an autoimmune disease caused by the production of anti-melanocyte antibodies and it may be associated with other autoimmune diseases. The objective of the present study was to investigate KIR and HLA gene polymorphisms and their association with vitiligo comparing with a control group. We genotyped 112 patients diagnosed with vitiligo and 250 healthy individuals for 16 KIR genes and their HLA ligands using PCR-SSO and PCR-SSP respectively. Our findings showed a risk factor for vitiligo in the interaction between the activating KIR2DS1 gene and its C2 ligand ($P=0.015$; OR: 2.06). There was also a significant association of the activating KIR2DS1 gene with the heterozygous C1/C2 ligand ($P=0.025$; OR: 2.26). The KIR2DS1/C2 interaction was found in 52.8% of vitiligo patients and in 35.2% of the control group; whereas the KIR2DS1/C1/C2 interaction was found in 54.7% of vitiligo patients and 34.9% of the control group. These findings suggest a possible risk factor related to the interaction between the activating KIR2DS1 gene and its C2 ligand, since this combination may be a disease susceptibility factor.

Keywords: HLA gene, KIR gene, vitiligo, NK cell.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NK: *Natural killer cells* – Células matadoras naturais.

KIR: *Killer immunoglobulin-like receptor* – Receptor do tipo imunoglobulina da célula NK.

HLA: *Human leukocyte antigen* – Antígeno leucocitário humano.

PCR: *Polimerase chain reaction* – Reação em cadeia da polimerase.

SSO: *Sequence-specific Oligonucleotides* – Sequência específica de oligonucleotídeos.

SSP: *Sequence specific primers* – Sequência específica de primers.

NKT: *Natural killer T cells* – Células matadoras naturais tipo célula T.

PUVA: *Ultraviolet A radiation* – Radiação ultravioleta A.

UVB: *Ultraviolet B radiation* – Radiação ultravioleta B.

CTLs: *Cytotoxic T lymphocytes* – Linfócitos T citotóxicos.

CLA: *Cutaneous lymphocyte-associated antigen* – Antígeno cutâneo linfocitário.

MHC: *Major Histocompatibility Complex* - Complexo Principal de Histocompatibilidade.

APS: *Autoimmune polyglandular syndromes* – Síndrome poliglandular autoimune.

LES: Lúpus eritematoso sistêmico.

TCR: *T cell receptor* – Receptor de célula T.

TNF: *Tumor necrosis factor* – Fator de necrose tumoral.

IFN: Interferon.

IL: *Interleukin* – Interleucina.

ADCC: *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* – Citotoxicidade celular dependente de anticorpo.

TNRF: *Tumor necrosis receptor family* – Família de receptores de necrose tumoral.

ILTs: *Ig-like transcripts* – Transcrição do tipo imunoglobulina.

LIRs: *Leukocyte Ig-like receptors* – Receptor do tipo imunoglobulina dos leucócitos.

LCR: Complexo de receptores leucocitários.

TM: Transmembrana.

ITIMs: *Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs* – Motivos inibidores do imunoreceptor tirosina.

ITAMs: *Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs* – Motivos ativadores do imunoreceptor tirosina.

Ile: Isoleucina.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vitiligo localizado em face e mão.

Figura 2: Lâmpada de *Wood* em diagnóstico de paciente com vitiligo.

Figura 3: Célula NK atacando célula tumoral.

Figura 4: Estrutura dos genes KIR.

Figura 5: Estrutura de haplótipos A e B.

Figura 6: Interação entre receptores KIR e seus ligantes HLA.

Figura 7: Interação entre células NK e célula alvo.

LISTA DE TABELAS: REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1: Receptores KIR e seus ligantes.

LISTA DE TABELAS: ARTIGO

Tabela 1: KIR gene frequencies (%) in controls (n=250) and vitiligo patients (112).

Tabela 2: Frequencies of KIR ligands in controls (n=250) and vitiligo patients (112)

Tabela 3: Inhibitory KIR gene frequencies in the presence and absence of their ligands in controls (250) and vitiligo patients (112).

Tabela 4: Activating KIR gene frequencies in the presence and absence of their ligands in controls (250) and vitiligo patients (112).

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
1.	R
EVISÃO DA LITERATURA.....	14
1.1 Estratégias para localizar e selecionar informações.....	14
1.2 Vitiligo.....	14
1.2.1 Quadro clínico e diagnóstico.....	14
1.2.2 Classificação.....	16
1.2.3 Tratamento	17
1.2.4 Etiopatogenia.....	18
1.2.5 Imunogenética	19
1.2.6 Associação com doenças autoimunes	21
1.3 Células Natural Killer	23
1.4 Receptores KIR	25
1.4.1 Nomenclatura KIR.....	26
1.4.2 Diversidade haplotípica.....	27
1.4.3 Ligantes dos receptores.....	28
1.5 Células NK e Vitiligo	31
2. JUSTIFICATIVA	33
3. OBJETIVOS	34
3.1 Objetivos Gerais	34
3.2 Objetivos específicos	34
REFERÊNCIAS	35
4. ARTIGO ORIGINAL	45
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
APÊNDICE.....	64
A.	P
rotocolo de pesquisa	64
B.	T
ermo de Consentimento Livre e Esclarecido - Pacientes.....	66
C.	T
ermo de Consentimento Livre e esclarecido - Controles.....	69

INTRODUÇÃO

O vitiligo é uma doença dermatológica, adquirida e não contagiosa, que se manifesta através de manchas branco-nacaradas. Seu aparecimento está relacionado com a perda de pigmentação cutânea devido à redução ou perda funcional dos melanócitos, células responsáveis pelo pigmento natural da pele, a melanina. Ocorre em qualquer faixa etária (comum aos 20 anos), raça ou sexo. A incidência mundial desta patologia varia de 0,1 a 8% e no continente Americano é estimada em 1% da população. [1,2,3,4].

As causas do vitiligo ainda não são bem conhecidas, no entanto, há estudos que associam essa doença à autoimunidade [5]. Com isso, o achado de possíveis polimorfismos genéticos se faz importante no futuro entendimento da patologia.

As células *Natural Killer (NK)* são células originadas na medula óssea, e juntamente com algumas células T (NKT) são importantes reguladores imunológicos [6]. Integram o sistema imune inato, funcionando como uma vigilância imunológica para o nosso organismo. Possuem ampla habilidade em mediar uma resposta imune contra células transformadas, tais como as infectadas por vírus e as tumorais [7,8,9].

As células NK reconhecem moléculas de HLA (Antígeno Leucocitário Humano) de classe I expressos na superfície de células-alvo. Quando a expressão está diminuída como na transformação tumoral, a célula NK pode ser ativada levando a morte da célula-alvo. As células NK são reguladas através de um balanço entre sinais que são gerados a partir de receptores de ativação e receptores de inibição [10,11]. Esses receptores são expressos na superfície das células NK, e são chamados de KIR (*killer cell immunoglobulin-like receptors*) [12,13].

Os receptores KIR são representantes da família das imunoglobulinas presentes na superfície celular, sendo expressos em células NK e em alguns linfócitos T. Estão localizados no braço longo do cromossomo 19 (19q13.4). São

divididos em grupos funcionais inibitórios e grupos funcionais ativadores, os quais regulam a função das células NK, que conforme a interação com seus respectivos ligantes podem causar ou não a lise da célula alvo [14, 15,16].

Portanto, o presente trabalho tem por objetivo estudar a associação dos genes KIR e HLA com o vitiligo. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sob o número 09-199.

1. LITERATURA

REVISÃO DA

1.1 para localizar e selecionar as informações

Estratégias

Esta revisão da literatura está focada nos aspectos imunológicos relacionados ao vitiligo e sua associação com polimorfismos de genes KIR e HLA. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: SciELO, PubMed e repositório digital – LUME. Foram realizadas buscas através dos termos “Vitiligo”, “HLA”, “KIR”, “autoimmune diseases”, “NK cells”.

1.2

Vitiligo

1.2.1 Quadro clínico e diagnóstico

O Vitiligo é uma doença dermatológica, adquirida, não contagiosa, com causa e origem ainda desconhecidas. Os sintomas se limitam ao aparecimento de manchas branco-nacaradas na pele, ocasionadas através da perda de pigmentação natural cutânea. Além da pele, há casos de despigmentação dos cabelos e cílios. Essa despigmentação é originária de uma disfunção ou redução no número de células epidérmicas chamadas de melanócitos, importantes por produzirem o pigmento cutâneo, a melanina [1, 2, 3, 4].

As manchas possuem formas variadas, geralmente são encontradas em formas centrífugas e rodeadas por pele com pigmentação normal. A despigmentação pode ocorrer em qualquer segmento do corpo, no entanto, há uma predileção ao aparecimento em locais como face, mãos (Figura 1), genitais e axilas [2]. Estudos descrevem locais preferenciais para o alastramento das manchas sendo aqueles onde sofram pressões ou traumatismos frequentes, tais como mãos, pés, joelhos e cotovelos [18, 19, 20].



Figura 1: Vitiligo localizado em face e mão.

Pode se manifestar em qualquer idade, sendo mais comum entre as faixas etárias de 10 a 15 anos, e de 20 a 40 anos [2]. Assim também, não há diferenciação entre sexo e raça. A frequência mundial desta patologia é muito variável, entre 0,1 a 8%. Na Europa existem registros de cerca de 0,5% da população acometida por esta doença, já no território Americano a incidência é por volta de 1% de sua população [3, 17].

O diagnóstico de vitiligo ocorre através de manifestações clínicas, onde o principal exame do paciente é pelo método da lâmpada de *wood*, muito importante na detecção de manchas em fase inicial (Figura 2). Já a biópsia da pele se torna desnecessária nesta patologia. Indícios sugerem que esta doença esteja associada a outras doenças autoimunes, tais como doenças tireoidianas, alopecia areata, diabetes tipo 1, entre outras. É recomendável a obtenção de exames clínico-laboratoriais que excluam a coexistência dessas doenças [19, 20, 21].

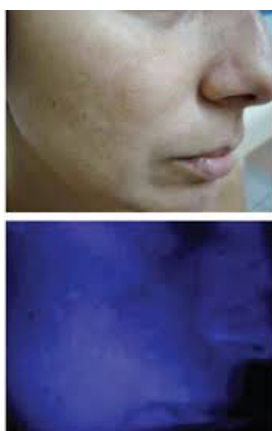


Figura 2: Lâmpada de *Wood* em diagnóstico de paciente com vitiligo.

É importante ressaltar que o vitiligo não é uma doença com riscos à vida dos pacientes. No entanto, relatos indicam que pacientes são acometidos por problemas psicossociais, e estes podem levar ao estresse, ansiedade, dificuldades em trabalhar e até transtornos como depressão, e outros distúrbios psíquicos [22, 23].

1.2.2

Classificação

O vitiligo foi dividido em alguns tipos e subtipos, de acordo com a forma de distribuição e sua extensão na pele. São eles, vitiligo localizado, generalizado e universal [21].

- Vitiligo
Localizado: Dividido nos seguintes subtipos:
 - Focal: com a presença de uma ou mais manchas acrômicas pequenas localizadas em uma determinada área, sem uma distribuição específica.
 - Segmentar: também conhecido como unilateral, possui uma ou mais máculas acrômicas que envolvem um segmento unilateral do corpo seguindo a distribuição de um dermatomo.
- Vitiligo
Generalizado: Lesões simétricas.
 - Acrofacial: com lesões acrômicas distribuídas na parte distal das extremidades e da face.
 - Vulgar: manchas acrômicas com distribuição aleatória.
 - Mista: é a união de lesões dos tipos acrofacial e vulgar, segmentar e acrofacial e/ou vulgar.
- Vitiligo
Universal: é a despigmentação de mais de 50% da pele e da mucosa.

Com base nesta classificação e de estudos na área, sabemos que o tipo vitiligo segmentar pode ser observado em pacientes com um aparecimento de forma

precoce, registros apontam para o surgimento entre os cinco e aos 30 anos de idade, além disso, não está associado com doenças autoimunes. Já a forma vulgar da doença ocorre em qualquer faixa etária, podendo evoluir através de surtos geralmente associados a doenças autoimunes, principalmente as tireoidianas [21].

1.2.3

Tratamento

O tratamento ao vitiligo ainda não é bem efetivo. A principal linha de tratamento visa estimular à produção de pigmento nas áreas de pele lesadas [21]. Estudos indicaram que os melanócitos não sintetizavam a melanina em condições normais, porém, se tornavam ativos ao contato com a luz ultravioleta, ou pela dermoabrasão. A partir desses dados, os autores concluíram que existia uma reserva de melanócitos nos folículos pilosos, tornando possível a metodologia de reativação dos melanócitos e conseqüentemente a repigmentação da área afetada [21, 25, 26].

Atualmente, há alguns tipos de tratamentos, no entanto, sabe-se que a maioria dos pacientes não apresentam bons resultados uma vez que é utilizada apenas de forma terapêutica [24]. Com isso se faz importante compreender os possíveis tratamentos e estruturar a melhor combinação entre eles para auxiliar na repigmentação dos pacientes. Os principais tratamentos hoje são os esteroides, fototerapia (PUVA, UVB), terapia cirúrgica, imunomoduladores, entre outros [21, 27].

Os esteroides orais são a primeira linha de tratamento prescrito aos pacientes portadores de vitiligo do tipo localizado [21, 27]. Atua na provável inibição da ação dos anticorpos contra os melanócitos [28]. O sucesso da repigmentação fica entre 50 a 75%, considerando regiões com pouca expansão de manchas e rápida regressão [27]. O uso desse medicamento deve ser monitorado cuidadosamente, uma vez que possui alto risco de toxicidade e efeitos adversos [19, 20].

A fototerapia inclui tratamentos tópicos a base de psoralenos e radiação por luz ultravioleta A (PUVA), e também a radiação de luz ultravioleta B (UVB), com boa resposta e cerca de 80% de repigmentação [27]. Os pacientes devem ingerir um medicamento a base de psoralenos de uma a duas horas antes da radiação UVA,

que estimula as imunocitoquinas e agem como sinais migratórios de células melanocíticas de pele normal para a pele lesada, sendo o rosto a região com melhor resposta ao tratamento. Efeitos adversos tais como eritema, vermelhidão momentânea e náuseas passageiras podem ocorrer, além disso, existem algumas contraindicações como as doenças hepáticas [21, 29]. Já a radiação UVB estimula a síntese de melanina aumentando a atividade da tirosina e estimulando a proliferação de melanócitos. Este tratamento é muito indicado devido aos poucos efeitos adversos que podem causar, inclusive evitando o fotoenvelhecimento [21, 30].

Apesar dos diversos métodos clínicos, existem pacientes que não respondem ao tratamento. Neste caso, é sugerido o tratamento cirúrgico, onde será feito um enxerto de células melanocíticas funcionais em pequenas regiões despigmentadas. Para esse procedimento é necessário alguns cuidados como observar se o vitiligo não está em progressão. Este método tem sucesso no vitiligo localizado, podendo chegar a 95% de repigmentação [31, 32].

Além destas modalidades de tratamentos, uma nova perspectiva da área terapêutica é o uso de imunomoduladores, considerando que o vitiligo possa estar envolvido com autoimunidade. Assim, o uso de medicamentos imunomoduladores e imunossupressores teriam a intenção de bloquear os autoanticorpos que auxiliam na destruição dos melanócitos. Contudo, ainda são poucos estudos que comprovam a eficiência deste tratamento [21, 33].

1.2.4

Etiopatogenia

Como já foi citada, a causa desta patologia permanece obscura, entretanto existem três teorias que foram propostas para explicar a destruição dos melanócitos. São elas:

- **Teoria Neural:**
tanto as células melanocíticas quanto o sistema nervoso são derivados da mesma linhagem embriológica, ou seja, da crista neural [34]. Essa teoria indicaria um possível mediador neuroquímico, uma toxina, que causaria a destruição de melanócitos ou inibiria a produção de melanina [35].

- **Teoria**
Citotóxica: sabe-se que os melanócitos têm como função proteger o organismo e assim eliminar produtos tóxicos tais como dopaquinona e indóis. Quando esta proteção está deficiente, ocorre a formação destes produtos a partir da síntese de melanina, com isso inicia o processo de destruição das células melanocíticas [21, 36, 37].
- **Teoria**
Imunológica: é a teoria mais aceita atualmente. Admite que o vitiligo seja uma doença autoimune, onde ocorreria a formação de anticorpos antimelanocíticos (ou autoanticorpos) e por consequência a destruição dos melanócitos [5], esses anticorpos circulantes estão diretamente ligados à extensão da despigmentação cutânea [38]. Essa teoria é corroborada por estudos que indicam a associação do vitiligo com outras doenças autoimunes, como diabetes melitus tipo 1, lúpus eritematoso sistêmico, esclerose sistêmica, tireoidite de Hashimoto, entre outras. Além disso, fica registrado que doenças autoimunes possuem uma diferenciação na expansão de linfócitos T e uma ativação das células *natural killer* (NK) [5, 21, 39]. Existem estudos que indicam uma associação dos antígenos do sistema HLA com o vitiligo, tais como HLA-DR4, -DR1, -Cw6, -A2, entre outros [40, 41].

Além da autoimunidade, outros fatores demonstraram serem importantes para a etiopatogenia da doença, tais como herança e fatores ambientais. A herança aponta um fator genético autossômico dominante ou autossômico recessivo ou multifatorial, indicando uma predisposição à doença. [42]. Já os fatores ambientais seriam o estresse, exposição solar intensa, exposição a alguns pesticidas. Cerca de 10 a 76% dos pacientes atribuem o fator de predisposição genética como causa da doença [43].

1.2.5

Imunogenética

Os fatores genéticos do vitiligo ainda não são bem conhecidos, estudos caracterizam o vitiligo como uma doença multifatorial e poligênica. Por algum tempo se considerou como uma doença que continha traços mendelianos, porém isso não se confirmou [2, 44]. Por envolver múltiplos genes e fatores de risco também

ambientais, o vitiligo hoje é qualificado como uma doença complexa [45]. Estudos indicam que 6% a 38% dos pacientes com vitiligo, possuem história familiar, geralmente parentes de primeiro grau, embora haja relatos de que esta patologia não seja transmitida por mecanismo mendeliano simples, sendo mais consistente acreditar em um fator poligênico [42, 45, 46, 47].

Há também evidências da associação do vitiligo com doenças autoimunes. Foi demonstrado que os pacientes de vitiligo possuem autoanticorpos e linfócitos T citotóxicos (CTLs) reativos contra antígenos melanocíticos chamados de antígenos cutâneos linfocitários (CLA) e que interagem com a selectina endotelial (E-selectina), facilitando a chegada do linfócito à pele [48, 49, 50, 51]. Os linfócitos T citotóxicos reativos melanócito-específicos que expressam o CLA causariam a destruição desses melanócitos e por consequência essa patologia [52].

Esses anticorpos anti-melanócitos estão presentes de forma significativa na circulação de pessoas com vitiligo [49, 53]. Um estudo de imunofluorescência indica que 30,9% dos pacientes com vitiligo foram positivos para anticorpos antimelanocíticos [53]. Isto foi confirmado por outras pesquisas, mostrando, inclusive, uma relação entre a incidência e o nível de autoanticorpos, quanto mais extensa é a despigmentação maior é a circulação desses anticorpos [38, 54]. As presenças destes autoanticorpos levam ao agravamento da perda de melanócitos [4, 55].

A partir dos achados, as análises genéticas foram estimuladas a fim de encontrar genes que pudessem indicar suscetibilidade ao vitiligo. Os primeiros estudos de associação genética apontaram para a importância de HLA e PTPN22 [56, 57]. Outros genes foram ganhando importância ao longo dos anos, assim como o NALP1 que foi identificado no cromossomo 17p e posteriormente renomeado para NLRP1 [58]. Possivelmente este gene seria uma espécie de chave reguladora do sistema imune inato que atua nas infecções bacterianas da pele [59]. Muitos estudos confirmaram a associação do gene NLRP1 com vitiligo e, também com outras doenças autoimunes, tais como diabetes melitus 1, doença de Addison, doença celíaca, esclerose sistêmica e doença inflamatória do intestino [60, 61]. O gene AIS1 também tem sido ligado ao vitiligo como um gene de suscetibilidade autoimune [62].

Em relação à associação com haplótipos HLA específicos dentro de várias populações [63, 64], algumas pesquisas mostram que foram detectados sinais de associação no MHC (complexo principal de histocompatibilidade), em ambas as regiões de classe I e II. Na classe I, a associação positiva ficou por conta do HLA-A*02. Já na região de classe II, a associação foi através de HLA-DRB1*04 [65]. Esses dados confirmaram pesquisas anteriores, os quais indicaram os mesmos genes de suscetibilidade [66, 67].

Em outro estudo relevante, realizado em 1983 por Foley e colaboradores, incluindo pacientes caucasóides com vitiligo e grupo controle, foi encontrada, uma associação positiva com HLA-DR4. Este trabalho foi o primeiro a relatar associação de vitiligo com HLA-DR [40]. Mais tarde outros pesquisadores corroboraram esta ideia, mostrando a mesma associação do HLA-DR4 em vitiligo, entretanto, ocorreram testes para outros locos como o HLA-DQ5 onde não foi comprovada a associação [68].

Com base nesses dados associativos, hoje sabemos que em doenças autoimunes, os pacientes possuem uma diferenciação na expansão dos linfócitos T e uma ativação das células *natural killer* (NK) [5, 39]. No que diz respeito ao vitiligo, estudos com células mononucleares do sangue periférico e utilizando anticorpos monoclonais com citometria de fluxo, microscopia de fluorescência e ensaios de citotoxicidade mediada pelo complemento resultou em diferenciações nas células NK e células T em pacientes com esta patologia [69]. Confirmando assim a autoimunidade do vitiligo.

1.2.6

Associação

com doenças autoimunes

A autoimunidade do vitiligo se dá por alguns pré-requisitos, são eles: associação com outras doenças autoimunes, história familiar de vitiligo, doenças autoimunes, presença de autoanticorpos de melanócitos e células T autorreativas, presença de fatores genéticos e respostas positivas a imunossuppressores terapêuticos [70]. Esses requisitos já foram discutidos e confirmados por diversos estudos.

Pesquisas relatam que existiria uma predisposição genética a grupos específicos de doenças autoimunes que incluiriam o vitiligo. Assim, aumentaria as chances de coexistência de doenças autoimunes e vitiligo [70]. Alkhateeb relatou que cerca de 30% dos pacientes com esta patologia apresentam pelo menos mais de uma doença autoimune [71].

Historicamente, o primeiro relato confirmado de vitiligo em associação com outras doenças foi feito por Thomas Addison em 1855, onde descreveu a associação com insuficiência adrenal idiopática [72, 73]. Já em 1908, um estudo comprovou esta ideia sugerindo a conexão de doenças autoimunes que ocorriam concomitantemente [74]. A partir desses relatos, pesquisas caracterizam o vitiligo como uma doença sistêmica, visto que alguns tipos de vitiligo, geralmente o tipo não segmentar, estariam associados a doenças autoimunes, mas também a patologias não autoimunes [4].

As associações melhor estudadas são com as doenças de Hashimoto e doença de Graves [4]. O relato de doenças tireoidianas é o mais prevalente, entre 0,5 a 43% dos pacientes acometidos pelo vitiligo. Desses, 24% são pacientes pediátricos [75, 76]. Além disso, o vitiligo é associado a doenças endocrinológicas, tais como diabetes melitus tipo 1, síndrome poliglandular (APS) tipo 1 e 2 e doença de Addison's [3, 72]. Doenças psiquiátricas também estão associadas com o vitiligo, no que se refere à depressão devido aos problemas estéticos e psicossociais que o próprio vitiligo acarreta, a qualidade de vida do paciente é gravemente comprometida [3, 17, 77]. Outra associação presente em parte dos pacientes de vitiligo é relativa a doenças de pele, tais como alopecia areata, psoríase, dermatites, entre outras [3, 72]. As frequências de doenças autoimunes como tireoidites, diabetes tipo 1 em adultos, anemia perniciosa, artrite reumatoide, psoríase e lúpus eritematoso sistêmico (LES) são elevadas entre os pacientes de vitiligo [71, 78, 79].

Também é importante salientar que pesquisas tem apontado uma ligação entre vitiligo e melanoma indicando que o sistema imune em resposta a células pigmentares malignas, possa iniciar o processo de destruição dos melanócitos. Em pacientes com melanoma são encontrados os mesmos autoanticorpos melanocíticos que em pacientes com vitiligo [3, 77, 80].

A descoberta de genes suscetíveis ao vitiligo, o estudo de autoanticorpos e o entendimento da associação com doenças autoimunes seria um marco na imunogenética desta patologia. Visto que, com esses achados, investimentos em métodos terapêuticos mais eficazes poderiam ser feitos, afim de estabelecer o controle da doença.

1.3 Células *Natural Killer*

As células *Natural Killer* (NK) constituem um subtipo de linfócitos, originadas na medula óssea, e juntamente com algumas células T (NKT) são importantes reguladores imunológicos [6]. Faz parte do sistema imune inato, funcionando como uma vigilância imunológica para o nosso organismo, sendo a primeira linha de defesa contra vírus, bactérias, tumores e microrganismos. Possui ampla habilidade em mediar uma resposta imune contra células transformadas, tais como as infectadas por vírus e as tumorais (figura 3) [7,8,9].

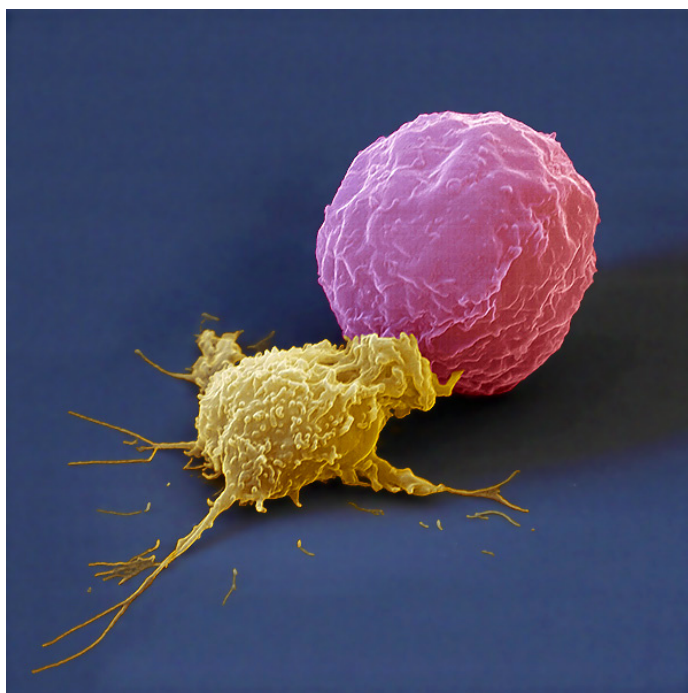


Figura 3: Célula NK (amarelo) atacando célula tumoral (rosa).
(Fonte: Eye of Science Photo Researchers, Inc.)

Morfologicamente, são células de baixa densidade, linfócitos granulares grandes, os quais se diferenciam principalmente na medula óssea e após entram na circulação. Já os grânulos dos linfócitos T citotóxicos (CTLs) e os grânulos das células NK contêm perforinas e granzimas, os quais são importantes para a atividade citotóxica. Esses grânulos podem estar em formas variadas dependendo do estágio de ativação celular [81, 82, 83]. Com isso, há a compreensão de que as células NK se diferenciam dos linfócitos T e B, sendo menos especializadas do que as células T. Fenotipicamente, as células NK são $CD3^-CD2^+CD16^+CD56^+CD14^-CD19^-$ e ao contrário das células T e B, não apresentam um antígeno único bem definido [83, 84, 85].

As NK estão localizadas no sangue periférico e também no baço, e raramente em outros órgãos linfoides, trato gastrointestinal e pulmão, com 10% a 15% das células mononucleares circulantes. Apresentam como marcadores de superfície CD16 e CD56, e ausência do receptor de célula T (TCR) [7, 8, 12, 84, 85].

A maturação dessas células ocorre na medula óssea, a partir de células progenitoras $CD34^+$. Nesta fase, as células NK não expressam receptores inibidores, porém, expressam receptores ativadores com uma eficiente atividade citolítica [86]. As NK são uma importante fonte de citocinas de imunorregulação, tais como fator de necrose tumoral alfa ($TNF-\alpha$), interferon gama ($IFN-\gamma$) e interleucinas como IL-3, IL-5, IL-10, IL-13, as quais regulam a função dos macrófagos, linfócitos, hemáceas e células dendríticas. E é através da expressão de CD-16 que as células NK possuem uma atividade citotóxica natural, mediando também a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* – ADCC) efetora na imunidade inata contra células infectadas por vírus e tumorais [87, 88].

Existem algumas citocinas específicas diretamente ligadas à estimulação das células NK, tais como IL-2, IL-12, IL-15 e IL-18. A IL-2 estimula a proliferação e as funções efectoras das células NK, através das cadeias β e γ e também do seu receptor, IL-2R. Já a IL-12, promove a ativação das células NK e a secreção de $IFN-\gamma$ pelas células T e NK. A IL-15 auxilia na ativação celular e na resposta imune contra os vírus. Por fim, a IL-18 auxilia a IL-12 na produção de $IFN-\gamma$ [6, 89].

Com isso, durante uma resposta imune, as células NK podem provocar ataques contra células alvo e interagir com as células dendríticas em tecidos periféricos [7, 12]. Para que isso ocorra, há dois caminhos citolíticos a seguir, o primeiro mecanismo é a apoptose ativada por grânulos, obtendo a liberação de perforinas e granzimas, já o segundo mecanismo é a apoptose induzida pela interação Fas/FasL, a qual é da família dos receptores de TNRF (necrose tumoral) [90, 91, 92].

A atividade citolítica e a produção de citocinas pelas células NK são reguladas por receptores de inibição ou ativação presentes na superfície da célula e também em alguns linfócitos T. Esse mecanismo é responsável por identificar agentes infecciosos e células transformadas. Os grupos dos receptores são divididos em três famílias distintas: a família com heterodímeros compostos de lectina, CD94/NKG2A ligante do HLA-E com função inibidora e NKG2D ligante do MICA com função ativadora [93]; a família de receptores de leucócitos com domínio tipo imunoglobulina, chamados de ILTs (*Ig-like transcripts*) e também denominados LIRs (*leukocyte Ig-like receptors*) expressos em células T e B, não sendo específicos de células NK; e a terceira família é do receptor com domínio do tipo imunoglobulina chamado KIR (*killer Ig-like receptor*) [12, 94].

Desse modo, a atividade das células *Natural Killer* é regulada pelo balanço entre sinais a partir de receptores ativadores e inibidores. Este processo ocorre através da participação de moléculas de classe I do complexo principal de histocompatibilidade – MHC I, principalmente as moléculas do sistema HLA (antígeno leucocitário humano). As células NK reconhecem células infectadas ou transformadas pela ausência ou presença das moléculas HLA na sua superfície. Quando a expressão está diminuída ou ausente de moléculas HLA nas células-alvo, ou ocorre um desequilíbrio entre sinais ativadores e inibidores mediados pelos receptores KIR, ou a célula NK é ativada e induzida a destruir a célula-alvo. Essas moléculas proteicas, importantes na destruição de células anormais são a expressão de um grupo de genes, denominado genes KIR [8].

1.4 KIR

Receptores

Os receptores KIR (*killer cell immunoglobulin-like receptors*) estão localizados no cromossomo 19q13.4, na região do complexo de receptores leucocitários – LCR, onde são codificados pelos genes KIR [14]. São representantes da família de imunoglobulinas presentes na superfície celular, principalmente em células NK, e também em alguns linfócitos T (NKT) [10, 11].

A família KIR é expressa por um sistema genético altamente polimórfico. Até o momento, foram descritos 17 genes, divididos em dois grupos funcionais, os inibidores, que evitam a lise da célula-alvo e os ativadores, os quais causam a lise da célula-alvo. O grupo inibitório possui oito receptores que são 2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL5A, 2DL5B, 3DL1, 3DL2 e 3DL3. Sete são referentes ao grupo dos receptores ativadores que são 2DL4, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5 e 3DS1. Além destes, existem dois pseudogenes, o 2DP1 e o 3DP1. Há quatro genes KIR que são chamados de genes estruturais, visto que estão presentes em todos os indivíduos e sugerem estabilidade em relação à recombinação genética, esses genes são 3DL3, 3DP1, 2DL4 e 3DL2 [12, 14, 15].

1.4.1

Nomenclatura

KIR

A nomenclatura dos receptores KIR foi determinada de acordo com a estrutura da cauda citoplasmática e seus domínios extracelulares de imunoglobulina. Os receptores apresentam uma cauda citoplasmática que podem ser curta, denominado por “S” (do inglês *short* – curto), ou ser longa, denominado por “L” (do inglês *long* – longo), dois ou três domínios (2D ou 3D) que são utilizados para ligarem-se ao sistema HLA e assim reconhecerem a célula-alvo, e uma porção transmembrana (TM) (Figura 4) [8].

Os receptores que possuem uma cauda citoplasmática de estrutura longa “L” são chamados de inibitórios, pois evitam a lise da célula-alvo. Estes apresentam dois motivos moleculares inibitórios ou ITIMs (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs*), os quais trabalham na inibição das células NK bem como em células T com atividade citotóxica através do recrutamento de fosfatases da tirosina [95, 96].

Já os receptores com cauda citoplasmática curta “S” são receptores ativadores, que causam a lise da célula-alvo pelo não reconhecimento como célula própria. Os sinais ativadores são o resultado da interação do receptor de cauda curta com o DAP-12 (adaptador de molécula). Estes possuem motivos moleculares ativadores ou ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) [97, 98, 99, 100].

Os domínios extracelulares têm por função o reconhecimento da célula-alvo. Os grupos com três domínios (3D) são conhecidos como D0, D1 e D2. Já os receptores com dois domínios (2D) são subdivididos em dois tipos distintos, o tipo 1 possui os domínios D1 e D2 referentes a KIR2DL1/2/3 e KIR2DS1/2/3/4/5, isto devido a remoção do éxon 3, e o tipo 2 é caracterizado pelos domínios D0 e D2 referentes a KIR2DL4/5 devido a deleção do éxon 4 [100, 101, 102].

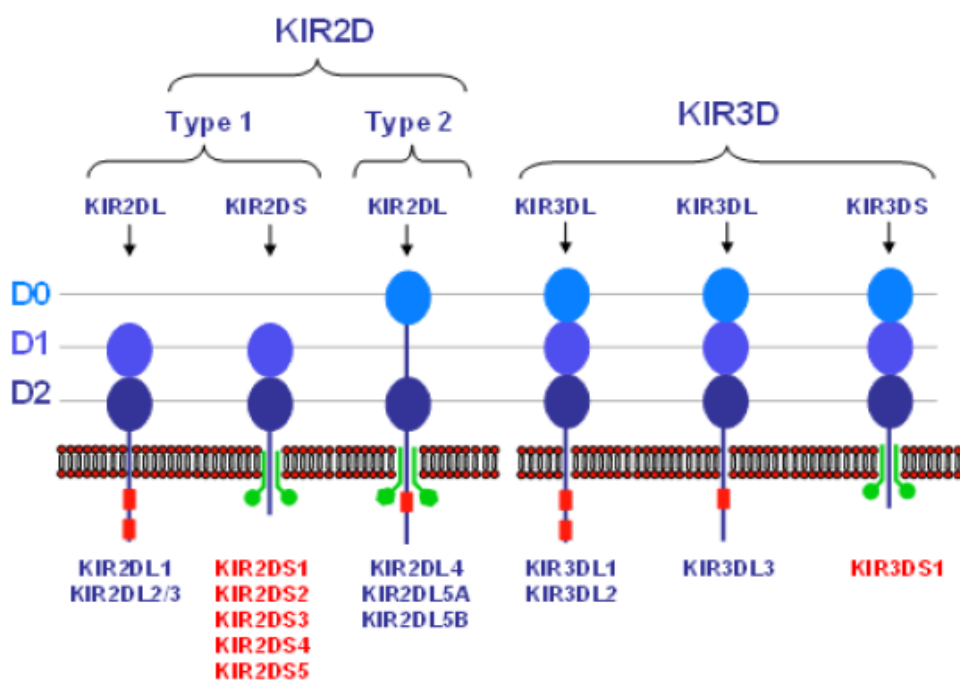


Figura 4: Estrutura dos genes KIR (Steven Marsh, Anthony Nolan Institute, UK).

1.4.2

haplotípica

Diversidade

Os genes KIR estão localizados no cromossomo 19, e permanecem agrupados em um complexo de receptores leucocitários [103, 104]. Estes formam haplótipos que são conjuntos de genes no mesmo cromossomo e são passados em

blocos de geração para geração [105]. Cada gene KIR possui uma ordem no cromossomo determinado em duas categorias, haplótipo A e haplótipo B (Figura 5) [8, 106].

O haplótipo A possui sete genes KIR, com predominância de genes que codificam a inibição de receptores, que se definem pela presença de 2DL1, 2DL3, 2DL4, 3DL1, 3DL2, 3DL3, e apenas um gene ativador, o 2DS4. Em contrapartida, o haplótipo B possui uma maior diversidade de genes, tanto ativadores quanto inibidores, predominando sinais de ativação, cujas combinações são: 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS5, 3DS1, 2DS4 e 2DL2 [8, 106].

Além disso, o KIR apresenta quatro genes chamados de estruturais ou de molduras (*frameworks*). Estes genes estão presentes em quase a totalidade de indivíduos e são representados por 3DL3, 3DP1, 2DL4 e 3DL2 [8, 15, 107].

A frequência destes haplótipos varia significativamente em diferentes populações [108]. Do mesmo modo, a diversidade haplotípica dos genes KIR sugere que possa ter efeitos variáveis dos receptores em diversas doenças, oferecendo proteção contra determinada doença ou predisposição a outra [109].

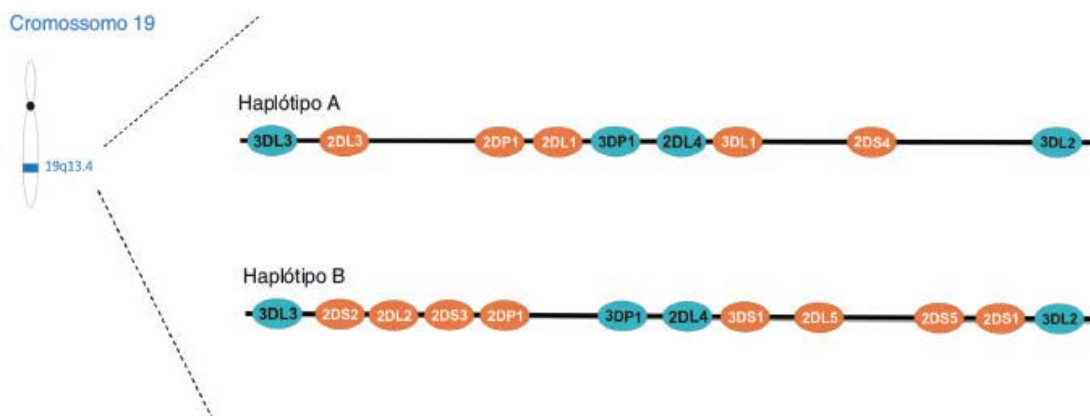


Figura 5: Estrutura de haplótipos A e B [110].

1.4.3

receptores KIR

Ligantes dos

As células NK têm como uma de suas funções, o reconhecimento de células estranhas no organismo através da interação dos receptores KIR presentes na sua

superfície celular e de moléculas HLA de classe I clássicas (HLA-A, HLA-B e HLA-C) e não clássicas (HLA-E e HLA-G). Portanto, a atividade das células NK necessita de um determinado antígeno HLA de classe I expresso na superfície das células e de um receptor KIR específico, inibidor ou ativador, expresso na célula NK [7, 109, 111]. A tabela 1 mostra os receptores KIR inibidores e ativadores e seus respectivos ligantes.

Tabela 1: Receptores KIR e seus ligantes.

KIR Inibidor	Ligante HLA
KIR2DL2 e KIR2DL3	HLA-C Grupo 1 (Cw 1, 3, 7, 8, 13,14)
KIR2DL1	HLA-C Grupo 2 (Cw 2, 4, 5, 6, 17,18)
KIR3DL1	Bw4 (B8, 27, 51, 53, 58, 13, 44, 52, 57)
KIR 3DL2	HLA-A (A3, 11)
KIR 2DL4	HLA-G
KIR Ativador	Ligante HLA
KIR2DS2	HLA-C Grupo 1 (Cw 1, 3, 7, 8, 13,14)
KIR2DS1	HLA-C Grupo 2 (Cw 2, 4, 5, 6, 17,18)
KIR3DS1	Bw4 (B8, 27, 51, 53, 58, 13, 44, 52, 57)

A interação KIR/HLA se dá no momento em que o receptor KIR se liga ao topo da α -hélice e também nas regiões expostas do peptídeo no HLA [112]. Essa especificidade é definida pelo dimorfismo do HLA-Cw na posição 80 e um dimorfismo na posição 44 do receptor KIR. Já os dimorfismos nas posições 77 e 80 da sequência do aminoácido definem dois subgrupos do HLA-C distintos sorologicamente, sendo o grupo C1 caracterizado pela serina na posição 77 e asparagina na posição 80 (Ser77/Asn80) e o grupo C2 caracterizado por asparagina na posição 77 e lisina na posição 80 (Asn77/Lys80). O grupo C1 é composto por HLA-Cw1, -Cw3, -Cw7, -Cw8, -Cw13, -Cw14 e seus ligantes são KIR2DL2, 2DL3 e 2DS2. Já o grupo C2 consiste em HLA-Cw2, -Cw4, -Cw5, -Cw6, -Cw17, -Cw18 e seus ligantes são KIR2DL1 e 2DS1 [113, 114, 115].

O HLA-B também é dividido em dois grupos: HLA-Bw4 e o HLA-Bw6. Os receptores KIR3DL1 e KIR3DS1 interagem com HLA-Bw4 – este difere do -Bw6 devido a um polimorfismo na posição 77 e 80 –, o KIR3DL1 interage com moléculas HLA-B quando forem sorologicamente –Bw4. No entanto, se estas apresentarem isoleucina (Ile) na posição 80 ocorrerá maior inibição de lise mediada pela célula NK. Em contrapartida, não se conhecem interações de alta afinidade com HLA-Bw6. O HLA-G é o tipo não clássico de HLA e se liga ao receptor KIR2DL4, possui pouco polimorfismo e é expresso em células endoteliais dos trofoblastos fetais, timo e córneas. O HLA-G quando solúvel, pode estimular a produção de citocinas e quimiocinas em células NK quando estas estiverem em repouso (Figura 6) [8, 116, 117].

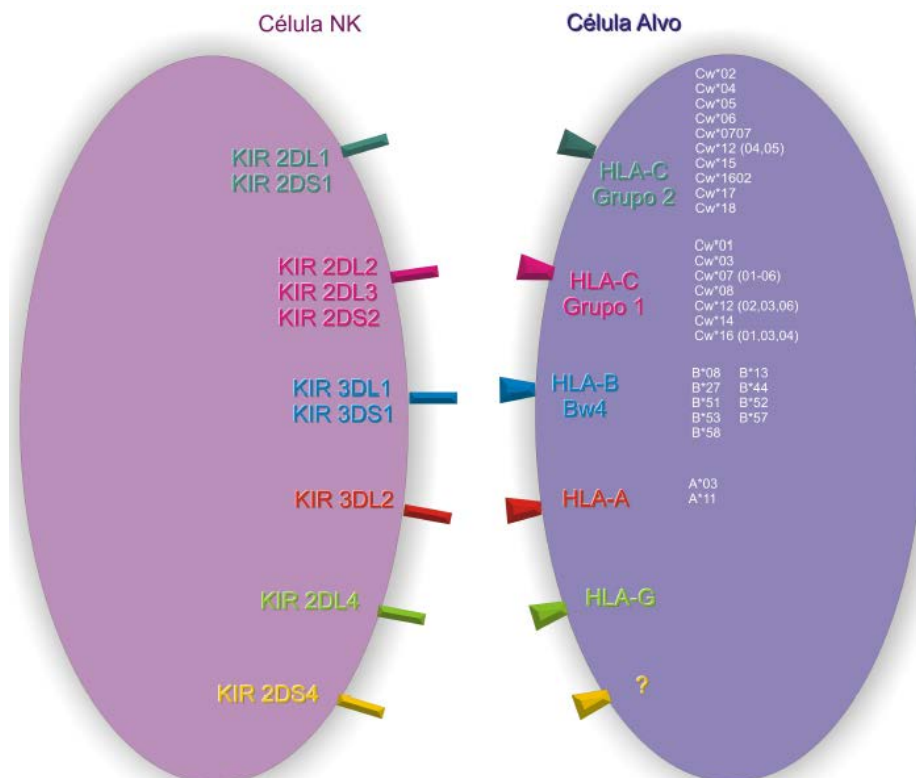


Figura 6: Interação entre receptores KIR e seus ligantes HLA [110].

Na figura 7 notamos alguns tipos de interações possíveis entre KIR/HLA. Sabemos que a atividade das NK é regulada por um equilíbrio entre sinais ativadores e inibidores provocados pelos receptores KIR [8, 117]. Na primeira situação (A), o sinal inibidor prevalece, visto que, não há ligação de nenhum receptor ativador, sendo assim, não ocorre a lise da célula alvo e essa interação é

considerada um efeito protetor já que não é permitido a autoagressão mediada pela célula NK. Na porção B, há uma ligação ocorrendo de receptor ativador na ausência de sinais inibidores e por consequência ocorre a lise da célula alvo. Nas representações C e D há situações onde sinais ativadores e inibidores ocorrem simultaneamente. Se houver mais sinais ativadores do que sinais inibidores acarreta a lise celular. Por outro lado, caso haja mais sinais inibidores do que sinais ativadores, a célula alvo estará protegida (Figura 7) [8, 117, 118].

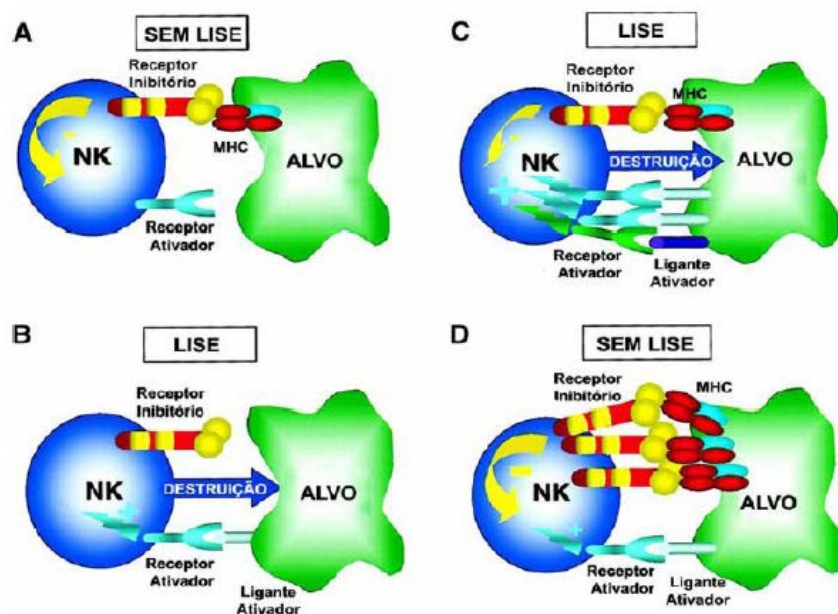


Figura 7: Interação entre células NK e células alvo [116].

Por fim, o papel das células NK na vigilância imunológica do nosso organismo, em que a ausência e/ou presença dos ligantes ativadores e inibidores é de suma importância para a compreensão de diversas doenças. Podendo diminuir ou aumentar as atividades das células NK e assim auxiliar em várias patologias onde a imunidade inata possui um importante papel [7, 8].

1.5

Vitiligo

Células NK e

As células NK são importantes para a vigilância imunológica e fazem parte da imunidade inata, averiguando continuamente se todas as células estão expressando corretamente o HLA de classe I [83]. No caso da expressão do HLA estar adequado, os receptores inibidores farão seu papel e protegerão as células alvo de uma

possível agressão. Caso contrário, se a expressão do HLA estiver diminuída ou deficiente, o sinal inibitório é enfraquecido e a célula NK é ativada induzindo a morte da célula alvo [119, 120].

Levando em consideração esses dados referentes ao funcionamento das células NK, estudos evidenciaram a importância do conhecimento dessas células também na compreensão do vitiligo. Basak e colaboradores (2008) estudaram 53 pacientes com vitiligo e compararam a 45 pessoas saudáveis utilizadas como grupo controle a fim de estudar o papel das células NK e linfócitos T através de citometria de fluxo. O resultado mostrou alterações nas células NK em pacientes com vitiligo em detrimento ao grupo controle, corroborando a ideia de aumento de receptores ativadores e diminuição de receptores inibidores, aumentando a susceptibilidade da doença [121].

2.**A****JUSTIFICATIV**

Existem relatos na literatura sobre a importância do conhecimento entre a associação das células Natural Killer (NK) e doenças autoimunes. No entanto, a patologia do vitiligo é pouco conhecida, não tendo relatos de associação de NK e moléculas de HLA de classe I.

Com isso, a identificação de associações entre polimorfismos KIR/HLA e o vitiligo poderia auxiliar não somente na melhor compreensão da fisiopatogênese, mas também na identificação de grupos de risco para o desenvolvimento da doença e de subgrupos de pacientes com melhor ou pior prognóstico. Este estudo tem por finalidade, investigar a associação dos genes KIR e moléculas de HLA de classe I e o vitiligo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o polimorfismo dos genes KIR e HLA em um grupo de pacientes com vitiligo e comparar as frequências dos genótipos com um grupo controle de indivíduos saudáveis.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a frequência dos diversos polimorfismos dos genes KIR (2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 2DL4, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 3DS1 e 2DP1) através do método PCR-SSO, em pacientes com vitiligo e grupo controle.
- Avaliar a frequência dos diversos polimorfismos dos genes HLA classe I (C1, C2, A3, A11 e Bw4), ligantes dos genes KIR, através do método PCR-SSP em pacientes com vitiligo e grupo controle.

REFERÊNCIAS

1. Lerner AB, and Nordlund JJ. Vitiligo. What Is It? Is It Important? *JAMA* 1978; 239(12): 1183-7.
2. Nordlund J J, Majumber PP. Recent investigations vitiligo vulgaris: advances in clinical research. *Dermatol Clin* 1997; 15: 69-78.
3. Alikhan A, Felsten LM, Daly M, and Petronic-Rosic V. Vitiligo: A Comprehensive Overview Part I. Introduction, Epidemiology, Quality of Life, Diagnosis, Differential Diagnosis, Associations, Histopathology, Etiology, and Work-Up. *J Am Acad Dermatol* 2011; 65 (3): 473-91.
4. Lotti T, and D'Erme AM. Vitiligo as a Systemic Disease. *Clin Dermatol* 2014; 32(3): 430-4.
5. Kemp EH, Waterman EA, and Weetman AP. Autoimmune Aspects of Vitiligo. *Autoimmunity* 2001; 34(1): 65-77.
6. Hamerman J A, Ogasawara K, Lanier LL. NK cells in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2005; 17: 29-35.
7. Parham P. Influence of Kir Diversity on Human Immunity. *Adv Exp Med Biol* 2005; 560: 47-50.
8. Jobim M, and Jobim LF. Natural Killer Cells and Immune Surveillance. *J Pediatr (Rio J)* 2008; 84(4) Suppl S58-67.

9. Jobim MR, Jobim M, Salim PH, Portela P, Jobim LF, Leistner-Segal S, et al. Analysis of KIR gene frequencies and HLA class I genotypes in breast cancer and control group. *Human Immunology* 2013; 74: 1130-1133.
10. Moretta A, Tambussi G, Bottino C, Tripodi G, Merli A, Ciccone E, et al. A novel surface antigen expressed by a subset of human CD3- CD16+ natural killer cells. Role in cell activation and regulation of cytolytic function. *J Exp Med* 1990; 171: 695-714.
11. Van Kaer L. NKT cells: T lymphocytes with innate effector functions. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 354-64.
12. Vilches C, and Parham P. KIR: Diverse, Rapidly Evolving Receptors of Innate and Adaptive Immunity. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 217-51.
13. Borrego F, Kabat J, Kim DK, Lieto L, Maasho K, Peña J, et al. Structure and Function of Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I Specific Receptors Expressed on Human Natural Killer (Nk) Cells. *Mol Immunol* 2002; 38(9): 637-60.
14. Suto Y, Maenaka K, Yalbe T, Hirai M, Tokunaga K, Tadok K, et al. Chromosomal localization of the human natural killer cell class I receptor family genes to 19q13.4 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 1996; 35: 270-272.
15. Rajalingam R, Hong M, Adams EJ, Shum BP, Guethlein LA, Parham P. Haplotypes in pygmy chimpanzee (Bonobo) resemble the conserved framework of diverse human KIR haplotypes. *J Exp Med* 2001; 193: 135-46.
16. Uhrberg M. Shaping the Human NK Cell Repertoire: An Epigenetic Glance at KIR Gene Regulation. *Mol Immunol* 2005; 42(4): 471-5.
17. Taieb A, Alomar A, Bohm M, Dell'anna ML, De Pase A, Elefthariadou V, et al. The writing group of the Vitiligo European Task Force (VETF) in cooperation with the European Academy of Dermatology and Venereology (EADV) and the Union Europeenne desecins Specialistes (UEMS). Guidelines for the management of vitiligo: The European Dermatology Forum consensus. *Br J Dermatol* 2013; 168 (1): 5-19.
18. Nogueira LSC, Zancanaro P, Azambuja R. Vitiligo e Emoções. *An Bras Dermatol* 2009; 84 (1): 39-43.
19. Cestari TF, Kraemer CK. Vitiligo. In: Ramos-e-Silva M e Castro MCR editores. *Fundamentos de Dermatologia*. Rio de Janeiro Atheneu 2009; 1415-1432.

20. Ortonne JP. Vitiligo e outras desordens de hipopigmentação. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP editores. *Dermatologia Rio de Janeiro* Elsevier 2011; 913-938.
21. Steiner D, Bedin V, Moraes M, Villas R. & Steiner T. Vitiligo. *An Bras Dermatol Rio de Janeiro* 2004; 79(3): 335-351.
22. Porter JR, Beuf AH, Lerner A, Nordlund J. Psychosocial effect of vitiligo: a comparison of vitiligo patients with "normal" control subjects, with psoriasis patients, and with patients with other pigmentary disorders. *J Am Acad Dermatol* 1986; 15 (2 Pt 1): 220-4.
23. Ghajarzadeh M, Ghiasi M, Kheirkhan S. Associations between skin diseases and quality of life: A comparison of psoriasis, vitiligo and alopecia areata. *Acta Medica Iranica* 2012; 50(7).
24. Groyzman V. Vitiligo [Internet]. *Medscape Dermatology*. [Acesso em setembro de 2014]. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/1068962>.
25. Staricco RG. Amelanotic melanocytes in the outer sheath of the hair follicles. *J Invest Dermatol* 1959; 33: 295-297.
26. Cui J, Shen LY, Wang GC. Role of hair follicles in the repigmentation of vitiligo. *J Invest Dermatol* 1991; 97: 410-416.
27. Zhang Y, Mooneyan-Ramchurn SJ, Zuo N, Feng Y & Xiao Shengxiang. Vitiligo nonsurgical treatment: a review of latest treatment researches. *Dermatol therapy* 2014; 27: 298-303.
28. Koga M. Vitiligo: a new classification and therapy. *Br J Dermatol* 1997; 255-261.
29. Grimes PE, Minus HR, Chakrabarti SG, Enterline J, Halder R, Gough JE, Kenney JA. Determination of optimal topical photochemotherapy for vitiligo. *J Am Acad Dermatol* 1982; 7(6): 771-778.
30. Calanchini-Postizzi E, Frenk E. Long-term actinic damage in sun-exposed vitiligo and normally pigmented skin. *Dermatologica* 1987; 174: 266-271.
31. Falabella R, Arrunátegui A, Barona MI, Alzate A. The minigrafting test for vitiligo: Detection of stable lesions for melanocyte transplantation. *J Am Acad Dermatol* 1995; 32: 228-232.
32. Moellman G, Klein-Angerer S, Scollay D, Nordlund JJ, Lerner A. Extracellular granular material and degeneration of keratinocytes in normally pigmented epidermis of patients with vitiligo. *J Invest Dermatol* 1982; 79: 321-330.

33. Pasricha JS, Khera V. Effect of prolonged treatment with levamisole on vitiligo with limited and low-spreading disease. *Int J Dermatol* 1994; 33(8): 584-587.
34. Reedy MV, Parichy DM, Erickson CA. Regulation of melanoblast migration and differentiation. In: *The pigmentary system physiology and pathophysiology*. New York: Oxford University Press 1998; 75-95.
35. Barnes L. Vitiligo and the Vogt-Koyanagi-Harada syndrome. *Dermatol Clin* 1988; 6: 229-239.
36. Lerner AB. On the etiology of vitiligo and gray hair. *Am J Med* 1971; 51: 141-147.
37. Ziegler L. Production of pteridines during hematopoiesis and T-lymphocyte proliferation-potential participation in the control of cytokine signal transmission. *Medicinal Research Reviews* 1998; 10: 95-114.
38. Naughton GK, Reggiardo MD, Bystryn JC. Correlation between vitiligo antibodies and extent of depigmentation in vitiligo. *J Am Acad Dermatol* 1986; 15: 978-981.
39. Mozzanica N, Villa ML, Foppa S, Vignati G, Cattaneo A, Diotti R, and Finzi AF. Plasma Alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone, Beta-Endorphin, Met-Enkephalin, and Natural Killer Cell Activity in Vitiligo. *J Am Acad Dermatol* 1992; 26(5) Pt 1: 693-700.
40. Foley L M, Lowe NJ, Misheloff E, and Tiwari JL. Association of HLADR4 with Vitiligo. *J Am Acad Dermatol* 1983; 8(1): 39-40.
41. Nordlund JJ. Hypopigmentation, vitiligo and melanoma: New data, more enigmas. *Arch Dermatol* 1998; 123: 1005-1011.
42. Nath SK, Majumder PP, Nordlund JJ. Genetic epidemiology of vitiligo: Multilocus recessivity cross-validated. *Am J Hum Genetic* 1994; 55: 981-990.
43. Behl PN, Bhatia RK. Treatment of vitiligo with autologous thin Thiersch's grafts. *Int J Dermatol* 1973; 12: 329-331.
44. Le Poole C, Van den Wijngaard RMJGJ, Nickoloff BJ, Das PK. Autoimmune aspects of depigmentation in vitiligo. *The Society for Invest Dermatol* 2004; 9(1): 68-72.
45. Spritz RA. Six decades of vitiligo genetics: Genomewide studies provides insights into autoimmune pathogenesis. *J Invest Dermatol* 2012; 132 (2): 268-273.

46. Ortonne JP, Mosher DB, Fitzpatrick TB. Vitiligo and other hypomelanoses of hair and skin. In: Ortonne, JP., Mosher, DB., Fitzpatrick, TB, editors. 'Topics in dermatology'. New York: Plenum Medical Book Co 1983; 257-8.
47. Majumder PP, Norlund JJ, Nath SK. Pattern of familial aggregation of vitiligo. *Arch Dermatol*. 1993; 129: 994-998.
48. Ochi Y, DeGroot LJ. Vitiligo in Grave's disease. *Ann Intern Med* 1969; 71: 935-40.
49. Naughton GK, Eisinger M, Bystryn J-C. Antibodies to normal human melanocytes in vitiligo. *J Exp Med* 1983; 158: 246-51.
50. Ogg GS, Dunbar PR, Romero P, Chen J-L, Cerundolo V. High frequency of skin-homing melanocyte-specific cytotoxic T lymphocytes in autoimmune vitiligo. *J Exp Med* 1998; 188: 1203-8.
51. Santamaria-Babí LF. CLA+T cells in cutaneous diseases. *Eur J Dermatol* 2004; 14: 13-8.
52. Dimitroff CJ, Kupper TS, Sackstein R. Prevention of leukocyte migration to inflamed skin with a novel fluorosugar modifier of cutaneous lymphocyte-associated antigen. *J Clin Invest* 2003; 112: 1008-18.
53. Farrokhi S, Farsangi-Hojjat M, Noohpished MK, Tahmasbi R, Rezaei N. Assessment of the immune system in 55 Iranian patients with vitiligo. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2005; 19: 706-11.
54. Harning R, Cui J, Bystryn J-C. Relation between the incidence and level of pigment cell antibodies and disease activity in vitiligo. *J Invest Dermatol* 1991; 97: 1078-80.
55. Kemp E H, Gavalas NG, Gawkrödger DJ, and Weetman AP. Autoantibody Responses to Melanocytes in the Depigmenting Skin Disease Vitiligo. *Autoimmun Rev* 2007; 6(3): 138-42.
56. Retornaz G, Betuel H, Ortonne JP. HLA antigens and vitiligo. *Br J Dermatol* 1976; 95: 173-5.
57. Birlea SA, Jin Y, Bennett DC, et al. Comprehensive association analysis of candidate genes for generalized vitiligo supports *XBP1*, *FOXP3*, and *TSL*. *J Invest Dermatol* 2011a; 131: 371-81.
58. Jin Y, Mailoux CM, Gowan K, Riccardi SL, LaBerge G, Bennett DC, et al. *NALP1* and vitiligo-associated multiple autoimmune disease. *New Engl J Med* 2007^a; 365: 10-8.

59. Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes: guardians of cytosolic sanctity. *Immunol Rev* 2009; 227:95–105.
60. Magitta NF, Bøe Wolff AS, Johansson S, Skinningsrud B, Lie BA, Myhr KM, et al. A coding polymorphism in NALP1 confers risk for autoimmune Addison's disease and type 1 diabetes. *Genes Immun* 2009; 10: 120–4.
61. Pontillo A, Vendramin A, Catamo E, Fabris A, Crovella S. The missense variation Q705K in CIAS1/NALP3/NLRP3 gene and an NLRP1 haplotype are associated with celiac disease. *Am J Gastroenterol* 2011; 106: 539–44.
62. Alkhateeb A, Stetler GL, Old W, et al. Mapping of an autoimmunity susceptibility locus (AIS1) to chromosome 1p31.3-P32.2. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 661–667.
63. Venneker GT, De Waal LP, Westerhof W, D'Amaro J, Schreuder GM, Ashgar SS. HLA associations in vitiligo patients in the Dutch population. *Dis Markers* 1993; 11: 187–190.
64. Buc M, Busova B, Hegyi E, Kolibasova K. Vitiligo is associated with HLA-A2 and HLA-DW7 in the Slovak populations. *Folia Biol* 1996; 42: 23–25.
65. Jin Y, Birlea SA, Fain PR, Gowan K, Riccardi SL, Holland PJ, et al. Variant of *TYR* and autoimmunity susceptibility loci in generalized vitiligo. *N Engl J Med* 2010a; 362: 1686–97.
66. Fain PR, Babu SR, Bennett DC, Spritz RA. HLA class II haplotype DRB1*04-DQB1*0301 contributes to risk of familial generalized vitiligo and early disease onset. *Pigment Cell Res* 2006; 19:51–7.
67. Liu JB, Li M, Chen H, Zhong SQ, Yank S, Du WD, et al. Association of vitiligo with HLA-A2: a meta-analysis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2007; 21: 205–13.
68. De Vijlder HC, Westerhof W, Schreuder GM, De Lange P, Claas FH. Difference in pathogenesis between vitiligo vulgaris and halo nevi associated with vitiligo is supported by an HLA association study. *Pigment cell* 2004; 17: 270-274.
69. Furham-Pierre DG, Walters CS, Halder RM, Pham HN, Vanderpool EA. Natural killer cell and lymphokine-activated killer cell activity against melanocytes in vitiligo. *J Am Acad Dermatol* 1995; 33: 26-30.

70. Poojary SA. Vitiligo and associated autoimmune disorders: A retrospective hospital-based study in Mumbai, India. *Allergol Immunopathol* 2011; 39 (6): 356-361.
71. Alkhateeb A, Fain RR, Thody A, Bennett DC, Spritz R. Epidemiology of vitiligo and associated autoimmune diseases in caucasian probands and their families. *Pigment Cell Res* 2003; 16: 208-14.
72. Lotti T, Hautmann G, Hercogova J. Vitiligo: disease or symptom? From the confusion of the past to current doubts. In: Lotti T, Hercogova J, eds. *Vitiligo Problems and solutions*. New York. NY: Basel: Marcel Dekker, Inc 2004; 1-14.
73. Zelissen PM, Bast EJ, Croughs RJ. Associated autoimmunity in Addison's disease. *J Autoimmun.* 1995; 8: 121-130.
74. Claude H, Gourgerot H. Insuffisance pluriglandulaire endocrinienne. *J Physiol Pathol Gen* 1908; 10: 469-80.
75. Handa S, Kaur I. Vitiligo: clinical findings in 1436 patients. *J Dermatol* 1999; 26: 653-657.
76. Kakourou T, Kanaka-Gantebein C, Papadopoulou A, Kaloumenou E, Chrousos GP. Increased prevalence of chronic autoimmune (Hashimoto's) thyroiditis in children and adolescents with vitiligo. *J Am Acad Dermatol* 2005; 53: 220-223.
77. Grunnet I, Howitz J, Reyman F, Schwartz M. Vitiligo and pernicious anemia. *Arch Dermatol* 1970; 101: 82-85.
78. Laberge G, Mailloux CM, Gowan K, Holland P, Bennett DC, Fain PR, Spritz RA. Early disease onset and increased risk of other autoimmune diseases in familial generalized vitiligo. *Pigment Cell Res* 2005; 18: 300-5.
79. Sun X, Xu A, Wei X, Ouyang J, Lu L, Chen M, et al. Genetic epidemiology of vitiligo: a study of 815 probands and their families from south China. *Int J Dermatol* 2006; 45: 1176-81.
80. Lindelof B, Hedbland MA, Sigurgeirsson B. On the association between vitiligo and malignant melanoma. *Acta Derm Venereol* 1998; 78: 483-484.
81. Freud AG, Caligiuri MA. Human natural killer cell development. *Immunol Rev* 2006; 214: 56-72.
82. Storek J, Witherspoon RP, Storb R. T cell reconstitution after bone marrow transplantation into adult patients does not resemble T cell development in early life. *Bone Marrow Transplant* 1995; 16: 413-25.

83. Yu J, Venstrom JM, O'Reilly R, Pring J, Hasan RS, and Hsu KC. Breaking tolerance to self, circulating natural killer cells expressing inhibitory KIR for non-self HLA exhibit effector function following T-cell depleted allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2009.
84. Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 1989; 47: 187-376.
85. Miller JS. The biology of natural killer cells in cancer, infection and pregnancy. *Exp Hematol* 2001; 29: 1157-68.
86. Farag SS, VanDeusen JB, Fehniger TA, Caligiuri MA. Biology and clinical impact of human natural killer cells. *Int J Hematol* 2003; 78(1): 7.
87. Farag SS, Caligiuri, MA. Human natural killer cells development and biology. *Blood Rev* 2006; 20: 123-37.
88. Ugolini S, Vivier E. Immunology: Natural killer remember. *Nature* 2009; 457: 544-5.
89. Del Vecchio M, Bajetta E, Canova S, Lotze MT, Wesa A, Parmiani G, et al. Interleukin-12: biologic properties and clinical application. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 4677-85.
90. Zhang AL, Colmenero P, Purath U, Teixeira CM, Hueber W, et al. Natural killer cells trigger differentiation of monocytes into dendritic cells. *Blood* 2007; 110: 2484-93.
91. Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 735-47.
92. Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H, et al. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* 2005; 42: 501-10.
93. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999; 285: 727-9.
94. Moretta L, Bottino C, Pende D, Castriconi R, Mingari MC, Moretta A. Surface NK receptors and their ligands on tumor cells. *Semin Immunol* 2006; 18: 151-8.
95. Fan QR, Mosyak L, Winter CC, Wagtmann N, Long OE, Wiley DC. Structure of the inhibitory receptor for human natural killer cells resembles haematopoietic receptors. *Nature* 1997; 389: 93-100.

96. Campbell KS, Dessing M, Lopez-Botet M, Cella M, Colonna M. Tyrosine phosphorylation of a human killer inhibitory receptor recruits protein tyrosine phosphatase 1C. *J Exp Med* 1996; 184: 93-100.
97. Lanier LL, Corliss BC, Wu J, Leong C, Phillips JH. Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* 1998; 391: 703-7.
98. Lanier LL. DAP10 and DAP12 associated receptors in innate immunity. *Immunol Rev* 2009; 227: 150-60.
99. Hsu K, Chida S. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotype and allelic polymorphism. *Immunol Rev* 2002; 190: 40-52.
100. Wagtmann N, Biassoni R, Cantoni C, Verdiani S, Malnati MS, Vitale M, Bottino C, Moretta L, Moretta A, and Long EO. Molecular clones of the p58 NK cell receptor reveal immunoglobulin-related molecules with diversity in both the extra and intracellular domains. *Immunity* 1995; 2(5): 439.
101. Biassoni R, Cantoni C, Falco M, Verdiani S, Bottino C, Vitale M, Conte R, Poggi A, Moretta A, Moretta L. The human leukocyte antigen (HLA)-C-specific "activatory" or "inhibitory" natural killer cell receptors display highly homologous extracellular domains but differ in their transmembrane and intracytoplasmic portions. *J Exp Med* 1996; 183(2): 645.
102. Marsh SG, Parham P, Dupont B, Geraghty DE, Trowsdale J, Middleton D, et al. Killer-Cell Immunoglobulin-Like Receptor (KIR) Nomenclature Report 2002. *Tissue Antigens* 2003; 62 (1): 79-86.
103. Parham P. Immunogenetics of killer cell immunoglobulin-like receptors. *Mol Immunol* 2005; 42(2): 459.
104. André P, Biassoni R, Colonna M, Cosman D, Lanier LL, Long EO, et al. New Nomenclature for Mhc Receptors. *Nat Immunol* 2001; 2(8): 661.
105. Wende H, Colonna M, Ziegler A, and Volz A. Organization of the leukocyte receptor cluster (LCR) on human chromosome 19q13.4. *Mamm Genome* 1999; 10(2): 154.
106. Martin MP, Kulski JK, Gaudieri S, Witt CS, Freitas EM, Trowsdale J, and Christiansen FT. Comparative genomic analysis, diversity and evolution of two KIR haplotypes A and B. *Gene* 2004; 335: 121.

107. Martin MP, Bashirova A, Traherne J, Trowsdale J, and Carrington M. Cutting edge: expansion of the KIR locus by unequal crossing over. *J Immunol* 2003; 171(5): 2192.
108. Witt CS, Dewing C, Sayer DC, Uhrberg M, Parham P, and Christiansen FT. Population frequencies and putative haplotypes of the killer cell immunoglobulin-like receptor sequences and evidence for recombination. *Transplantation* 1999; 68(11): 1784.
109. Parham P. Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor Diversity: Balancing Signals in the Natural Killer Cell Response. *Immunol Lett* 2004; 92(1-2): 11-3.
110. Salim P, Jobim M, Jobim LF, Xavier RM. Autoimmune rheumatic diseases and their association with killer immunoglobulin-like receptor genes. *Rev Bras Reumatol* 2011; 51(4): 351-64.
111. Boyington JC, Motyka SA, Schuck P, Broows AG, Sun PD. Crystal structure of an NK cell immunoglobulin-like receptor complex with its class I MHC ligand. *Nature* 2000; 405: 537-43.
112. Stewart CA, Laugier-Anfossi F, Vely F, Saulquin X, Riedmuller J, et al. Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(37): 13224.
113. Winter CC, Long EO. A single amino acid in the p58 killer cell inhibitory receptor controls the ability of natural killer cells to discriminate between the two groups of HLA-C allotypes. *J Immunol* 1997; 158: 4026-8
114. Long BR, Ndhlovu LC, Oksenberg JR, Lanier LL, Hecht FM, Nixon DF, and Barbour JD. Conferral of Enhanced Natural Killer Cell Function by Kir3ds1 in Early Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J Virol* 2008; 82(10): 4785-92.
115. O'Connor GM, Guinan KJ, Cunningham RT, Middleton D, Parham P, Gardiner CM. Function polymorphism of the KIR3DL1/S1 receptor on human NK cells. *Immunol* 2007; 178: 235-41.
116. Carr WH, Pando MJ, Parham P. KIR3DL1 polymorphisms that affect NK cell inhibition by HLA-Bw4 ligand. *J Immunol* 2005; 175: 5222-9.
117. Moretta A, Sivori S, Vitale M, Pende D, Morelli L, Augugliaro R, et al. Existence of both inhibitory (p58) and activating (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells. *J Exp Med* 1995; 182(3): 875-84.

118. Boyton RJ, and Altmann DM. Natural Killer Cells, Killer Immunoglobulin-Like Receptors and Human Leucocyte Antigen Class I in Disease. *Clin Exp Immunol* 2007; 149(1): 1-8.
119. Arrenberg P, Halder R, and Kumar V. Cross-regulation between distinct natural killer T cell subsets influences immune response to self and foreign antigens. *J Cell Physiol* 2009; 218(2): 246.
120. Draghi M, Yamata N, Gleimer M, Yamata M, Valiante NM, and Parham P. Single-cell analysis of the human NK cell response to missing self and its inhibition by HLA class I. *Blood* 2005; 105(5): 2028.
121. Basak PY, Adiloglu AK, Koc IG, Tas T, and Akkaya VB. Evaluation of Activatory and Inhibitory Natural Killer Cell Receptors in Non-Segmental Vitiligo: A Flow Cytometric Study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2008; 22(8): 970-6.

4. ORIGINAL

ARTIGO

A study of the frequency of KIR genes and their HLA ligands in patients with vitiligo and healthy controls

Vanessa Dias^{a,b}, Pâmela Portela^a, Patrícia H. Salim^a, Luiz Fernando Jobim^{b,c}, Joice Merzoni^{a,b}, Tânia Cestar^d, Gilberto Schwartzmann^{c,e,f}, Rafael Roesler^{e,f,g}, Mariana Jobim^{b}*

^aPostgraduate Course in Medical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^bDepartment of Immunology, Hospital de Clínicas, Porto Alegre, Brazil

^cDepartment of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^dDepartment of Dermatology, Hospital de Clínicas, Porto Alegre, Brazil.

^eCancer Research Laboratory, University Hospital Research, Center (CP-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^fNational Institute for Translational Medicine (INCT-TM), Porto Alegre, RS, Brazil

^gLaboratory of Molecular Neuropharmacology, Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Correspondence

*Mariana Jobim, MD

Department of Immunology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, Brazil

Tel: 55 51 3359 8020; Fax: 55 51 3359 8308

e-mail: mjobim@hcpa.ufrgs.br

Supported by grants from FIPE-HCPA and CAPES.

Abstract

Vitiligo is a skin disease characterized by white patches on the skin, caused by destruction of pigment-forming cells (melanocytes). Natural killer cells are part of the innate immune system and they use their KIRs (killer-cell immunoglobulin-like-receptors) to recognize class I HLA molecules in cells. When class I HLA molecules are not recognized, e.g.: tumour cells or virus-infected cells, NK cells induce the death of target cells. One of the possible aetiologies for vitiligo is immunological. The objective of the present study was to investigate the polymorphism of KIR and HLA genes and their association based on the comparison of a group of patients with vitiligo and a control group. We genotyped 112 patients diagnosed with vitiligo and 250 healthy individuals for 16 KIR genes and their HLA ligands using PCR-SSO and PCR-SSP. Our findings showed a risk factor for vitiligo in the interaction between the activating KIR2DS1 gene and its C2 ligand. Our findings showed an interaction between the activating KIR2DS1 gene and its C2 ligand and between the activating KIR2DS1 gene with C1/C2 ligand. Our results suggest that those associations could be markers of a possible risk factor or even a susceptibility factor for the disease.

Keywords: HLA gene, KIR gene, vitiligo, NK cell.

1. INTRODUCTION

Vitiligo is an acquired, non-contagious, skin disease. Its main clinical characteristic is the occurrence of skin white patches. That is caused by the loss of natural skin pigmentation, due to the reduction in the number and function of melanocytes – the cells responsible for producing the skin pigment called melanin. Vitiligo affects all races and both genders equally. Although it affects all age groups, it is more prevalent in individuals around 20 years of age. The global prevalence of vitiligo ranges from 0.1 to 8%. In the USA, its estimated prevalence is about 1%. The etiology of vitiligo remains unknown [1, 2, 3].

Its classification is based on clinical evaluation according the amount of skin affected and its distribution on the body surface. Diagnosis is established by clinical examination using Wood's light to detect early stage patches. Next, in order to rule out other skin diseases, a skin biopsy is performed. Clinical or laboratory criteria alone, are not able to establish the prognosis [4].

The causes leading to the development of vitiligo have not been definitely determined. However, some theories have tried to explain this disease, such as:

neural theory, cytotoxic theory, and immune theory, among others. The neural theory suggests that the accumulation of neurochemical substances, such as a toxin, causes the destruction of melanocytes or inhibits the production of melanin [5, 6, 7]. The cytotoxic theory postulates that intermediary metabolites, such as indoles and dopaquinone, play a role in the destruction of melanocytic cells [6]. The immune theory admits that vitiligo is an autoimmune disease because of the formation of anti-melanocyte antibodies (or autoantibodies), thus destroying the melanocytic cells circulating within the patient's body [8].

In various studies, vitiligo has been associated to other autoimmune diseases, such as type 1 diabetes, lupus, Hashimoto's thyroiditis, and psoriasis [1, 3, 8], thus reinforcing the idea that vitiligo has also an autoimmune origin. Researchers have reported that autoimmune diseases have different expansion rate of T lymphocytes [8] and different activation rate of natural killer (NK) cells [9].

NK cells are part of innate immunity and are able to recognize and fight tumour-transformed cells and virus-infected cells [10, 11, 12]. Class I HLA (human leukocyte antigen) molecules are recognized by NK cell surface receptors, killer immunoglobulin-like receptors (KIRs) [11, 13, 14]. KIRs are divided into inhibitory and activating functional groups. Inhibitory receptors prevent cell lysis, thus inhibiting cellular action and preventing diseases [15, 16]. Conversely, activating receptors do not recognize the target cell, thus allowing target cell lysis [17, 18]. The imbalance between activating and inhibitory signals also contributes to cell lysis [11]. Nevertheless, when the expression of class I HLA is reduced or impaired, such as during tumour transformation, the inhibitory signal becomes weak and NK cells are activated, thus leading to cell death [14, 19].

To date, 17 genes and pseudogenes located on chromosome 19q13 have been described. Eight of these genes are inhibitory receptors (2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5A, 2DL5B, 3DL1, 3DL2, and 3DL3); seven are activating receptors (2DL4, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, and 3DS1); and two are pseudogenes (2DP1 and 3DP1). Among these, there are four framework genes, i.e., genes that are always present in individuals (3DL3, 3DP1, 2DL4, and 3DL2) [20, 21]. KIR ligands are class I HLA molecules whose loci are HLA-A, -B, and -C. Each locus binds to certain KIR genes according to its specificity. There is a dimorphism at position 80

(KIR-binding epitope); thus HLA-C alleles may be divided into two groups: HLA-C1 group, asparagine transporter comprising HLA-Cw1, -Cw3, -Cw7, -Cw8, -Cw13, and -Cw14, and HLA-C2 group, lysine transporter comprising HLA-Cw2, -Cw4, -Cw5, -Cw6, -Cw17, and -Cw18. KIR2DS2, KIR2DL2, and KIR2DL3 receptors bind to the C1 group, whereas the alleles of the C2 group bind to KIR2DS1 and KIR2DL1 receptors [22]. HLA-A has some groups, including A3 and A11, which are recognized by KIR3DL2 [23, 24]. HLA-B has the Bw4 and Bw6 groups; the Bw4 group is recognized by KIR3DL1 and KIR3DS1, whereas no KIR-HLA interactions have been detected in the Bw6 group [25].

Several studies have shown the importance of investigating NK cells in patients with vitiligo. In one study, an association of class II HLA with patients with vitiligo and its subtypes was observed. This study recruited 40 patients with vitiligo vulgaris and 36 patients with halo nevus associated with vitiligo. For comparison purposes, 2,400 healthy individuals were used. The authors reached the conclusion that vitiligo vulgaris has a positive association with HLA DR-4 ($P=0.0022$) and HLA DR-53 ($P=0.0153$); however, there was a negative association with HLA DR-3 ($P=0.0024$). These associations were not found in patients with halo nevus, thus suggesting that there are different pathogenic mechanisms [26].

In previous studies, we have reported the occurrence of HLA and KIR gene polymorphisms in a variety of disorders, including breast [12] and prostate cancer [27], type I diabetes [28], chronic inflammatory bowel disorders [29] and systemic sclerosis [46]. To the best of our knowledge, this is the first study to be published in the literature, in which the prevalence of polymorphisms of HLA and KIR genes are reported in patients with vitiligo as compared to healthy controls.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Patients and Control Group

With the purpose of investigating the possible association of KIR genes and HLA alleles with vitiligo, we studied 112 Caucasian patients diagnosed with vitiligo

from the Dermatology Unit of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. For control, we studied 250 individuals without any skin or autoimmune diseases from the Brazilian Bone Marrow Donor Registry (REDOME).

This study was approved by the Research Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (IRB0000921), and all patients signed an informed consent form agreeing to participate in the study.

2.2 KIR typing

Blood samples were collected in tubes with EDTA anticoagulant. DNA was extracted using the salting out method [30]. DNA samples were genotyped using polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotide probe - PCR-SSO (One-Lambda Inc., Canoga Park, CA, USA), which uses Luminex technology, for identification of presence or absence of 16 KIR genes (2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 3DS1, 2DP1, and 3DP1). Target DNA was amplified using three specific primer sets for exons 3, 4, 5, 7, 8, and 9. The temperature conditions for PCR reactions were as follows: 3 min denaturation at 96 °C, followed by 5 cycles of 20 seconds at 96 °C, 20 seconds at 60 °C, and 20 seconds at 72 °C; 30 cycles of 10 seconds at 96 °C, 15 seconds at 60 °C, and 20 seconds at 72 °C. Finally, there was an extension step at 72 °C during 10 minutes. The PCR product was denatured and rehybridised in a single strand to complementary DNA probes (sequence specific oligonucleotide probes) conjugated with fluorescent microspheres. After washing the microspheres, biotinylated DNA (from the sample) was marked with Streptavidin, R-Phycoerythrin Conjugate (SAPE). Reading of reactions was conducted using a LABScan™ 100 flow cytometer (Luminex Inc., Austin, TX, USA). The analysis of the results was conducted using the HLA FUSION RESEARCH software, which collects data and determines alleles.

HLA typing

HLA typing Cw epitope C1 (Cw 01, 03, 07 {01-06}, 08, 12 {02, 03, 06}, 14, 16 {01, 03, 04}), and C2 (Cw 02, 04, 05, 06, 0707, 12 {04, 05}, 15, 1602, 17, 18) was done using polymerase chain reaction with sequence-specific primer (PCR-SSP), as described by Jones et al., 2006 [31]. HLA-Bw4, A3, and A11 typing was also done

using PCR-SSP as described by Bunce et al, 1995 [32]. Internal control was used for PCR reaction. The temperature conditions for PCR reactions were as follows: 1 minute at 96 °C, followed by 5 cycles of 20 seconds at 96 °C, 45 seconds at 70°C, 45 seconds at 72°C; 21 cycles of 25 seconds at 96 °C, 50 seconds at 65 °C, 30 seconds at 72 °C; 4 cycles of 30 seconds at 96 °C, 60 seconds at 55 °C, 90 seconds at 72 °C, and, finally, 1 cycle of 1 minute at 20 °C. The product of amplification was detected by electrophoresis in 1% agarose gel containing 0.02 µL/mL of ethidium bromide. After electrophoresis for 20 minutes at 200 volts, DNA was viewed using an ultraviolet transilluminator.

2.3 Statistical Analysis

Comparison of the KIR gene frequency with the control group was conducted using Pearson's chi-square test with continuity correction. And when the expected difference between the two groups was small, we used Fisher's exact test. Odds ratio (OR), confidence intervals (95% CI) and significance values ($P < 0.05$) were calculated using SPSS for Windows version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The number of genes used was adjusted for with the Bonferroni correction.

3. RESULTS

We evaluated KIR gene frequencies of 15 loci for cases and controls. These results are shown in Table 1. There was no statistical significance differences in any loci both for cases and controls.

In Table 2, we analysed the frequency of ligands for the KIR genes, A3, A11, Bw4, and group 1 (C1) and group 2 (C2) HLA-C. We found significance for the presence of the Bw4 ligand ($P < 0.001$), in 171 (68.4%) individuals in the control group vs. 54 (48.2%) vitiligo patients. However, this ligand was not significant when it was analysed with the inhibitory KIR3DL1 gene and the activating KIR3DS1 gene (Table 4). The other ligands did not show statistical significance when cases and controls were compared.

In order to evaluate the interaction between KIR genes and their ligands, we divided data into two groups: inhibitory genes and their ligands (Table 3) and

activating genes and their ligands (Table 4). Interaction between inhibitory genes and their ligands had no statistical significance when the control group and cases were compared (Table 3). Significant statistical differences, such as the association between the activating KIR2DS1 gene and its C2 ligand ($P=0.015$; OR: 2.06; 95%CI: 1.14-3.72) and heterozygosity for KIR2DS1 and C1/C2 ($P=0.025$; OR: 2.26; 1.10-4.66), can be observed in table 4. KIR2DS1/C2 interaction was present in 52.8% of vitiligo patients and in 35.2% of healthy individuals. KIR2DS1/C1/C2 interaction shows heterozygosity among individuals, being present in 54.7% of vitiligo patients and 34.9% of healthy individuals. Both the first and the second interaction indicate a possible risk factor for vitiligo susceptibility, as it is a prevalent activating gene. The other combinations did not show any significant differences.

4. DISCUSSION

Vitiligo is a skin disease that has been scarcely studied; therefore, its aetiology is unknown. Specific data available in the literature about vitiligo include clinical data based on the disease distribution and extent of skin affected. In addition, there are some theories that can help to explain skin depigmentation [4]. The theory that best explains the present study is the immune theory, which advocates that vitiligo is an autoimmune disease because some studies have suggested the presence of differences in T lymphocytes [8] and an activation of NK cells in autoimmune diseases [9].

Therefore, in order to better understand autoimmune diseases, including vitiligo, there is need to increase our knowledge on the role played by important immune cells, such as NK cells, in the human body defence system. The importance of these cells has been demonstrated by several studies. Because NK cells are part of the innate immune system, they participate in the immune surveillance by means of self and non-self discrimination, thus lysing virus-infected cells or tumour-transformed cells [11, 12].

Considering these data, Basak et al (2008) studied 53 patients with vitiligo and compared them with a control group of 45 healthy subjects to examine the role of NK

cells and T lymphocytes using flow cytometry. These authors found changes in the NK cells of patients with vitiligo when compared with the control group, thus supporting the idea of more activating receptors and fewer inhibitory receptors, which increases the susceptibility to the disease [33].

As mentioned before, there is little immune data regarding vitiligo. Therefore, we aimed to study the association of KIR receptors on NK cells with class I HLA. Our study showed a higher frequency of association with the activating KIR2DS1 gene and its C2 ligand ($P=0.015$; OR: 2.06) and heterozygosity for KIR2DS1 and the C1/C2 ligands ($P=0.025$, OR: 2.26) in patients compared with the control group. The presence of the activating KIR2DS1 gene has been reported in several autoimmune diseases, which may confirm its important role in autoimmunity.

In another study of 48 Caucasian patients with vitiligo compared with 979 healthy subjects, the authors found a positive association of vitiligo with class II HLA-DR4 in patients with vitiligo. This was the first study to be published relating HLA-DR to vitiligo [34]. Later, another study confirmed the association with HLA-DR4 in patients with vitiligo. Seventy-six patients were analyzed for DR and DQ loci, resulting in significant findings for HLA-DR4 ($P=0.0022$) and HLA-DR53 ($P=0.0153$) [26].

Lotti et al studied vitiligo in association with other autoimmune diseases, such as type 1 diabetes, thyroid diseases, and Graves' disease, reaching the conclusion that vitiligo can be considered a systemic disease [3]. This association has been also reported in other studies. In Italy, a study demonstrated that 18.5% of vitiligo patients had thyroid disorders [35]. In another study, 24% of paediatric patients with vitiligo had thyroid diseases [36, 37].

A study of psoriasis vulgaris showed a positive association of the KIR2DS1 gene and its C2 ligand in a group of 79 Brazilian patients compared with 110 controls ($P<0.009$). The authors reported that this association could cause susceptibility to vitiligo [38]. Other studies support the same theory of the study described above. American, Japanese, and Polish studies have also found a positive change in the activating KIR2DS1 gene in psoriasis vulgaris and psoriatic arthritis [39, 40, 41].

There are reports of other autoimmune diseases that share the same activation of this gene. A study of 304 Canadian patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and 90 patients with scleroderma compared with 416 normal controls demonstrated the presence of the activating KIR2DS1 and KIR2DS2 genes in both diseases, showing possible susceptibility to these diseases [42, 43]. Conversely, another study conducted in Japan investigated SLE in 417 patients with SLE, 72 patients with rheumatoid arthritis (RA) and 256 healthy controls and showed an increase in the inhibitory KIR2DL5 gene ($P=0.005$) in the control group compared with the groups of patients with SLE and RA, thus associating this gene with a protective effect against the diseases mentioned above [44].

It is also important to report that the imbalance between activating and inhibitory signals may also lead to predisposition to these and other diseases. Another study related to SLE showed an imbalance between the activating KIR2DS1 gene and the inhibitory KIR2DL2 gene in these patients. Such finding corroborates the idea that the imbalance between activating and inhibitory signalling is also considered a predisposition to the disease [45]. However, our study did not show any statistical significance either related to the activating KIR2DS2 gene or to other inhibitory genes.

Conversely, many studies indicate excessive inhibition in healthy subjects when compared to patients. A study of systemic sclerosis (SSc) evaluated and compared 110 patients diagnosed with SSc to 115 healthy individuals. Of these, 65.2% of controls and 29.1% of patients had a higher frequency of the KIR2DL2 gene, confirming what has already been suggested in other studies: a higher frequency of inhibitory genes in control groups may indicate a protective effect against the disease. The same study also showed a high prevalence of the KIR2DS2 and KIR2DL2 genes, showing that the imbalance interferes with susceptibility to SSc; however, there was a high frequency of these genes in controls (57.4%) compared to patients (28.2%) ($P=0.0001$). In this study, the inhibitory gene was more prevalent, thus preventing NK cells from lysing healthy cells. The presence of the KIR2DS2 gene and the absence of the KIR2DL2 gene ($P=0.008$) facilitates cell lysis, thus increasing the risk of disease. Such data were more frequently found in patients (28%) than in healthy individuals (2%) [46]. In Canada, 90 patients with SSc and 416

healthy controls were investigated and the results showed a high frequency of the activating KIR2DS1 gene in patients (80%) compared to the healthy group (62%) [43]. The findings of the Canadian study were confirmed in our study, indicating a possible susceptibility to the disease.

RA is another autoimmune disease that is often investigated because it encompasses several subgroups of diseases with different genetic origins. Therefore, various studies have shown different relationships between RA and KIR genes. In 2007, a study reported that KIR2DL2 and KIR2DS2 genes were more frequent among patients with extra-articular manifestations and in those with vasculitis, which was not found in the control group or in patients without these clinical manifestations. However, the frequency of KIR2DS1 and KIR3DS1 genes were lower in patients without bone erosions compared to a control group. Such studies reveal how different can be the relationships between KIR and various clinical manifestations [47].

A recent study conducted in India recruited 100 patients diagnosed with RA and compared them with 100 healthy controls. The authors' analysis showed an increased frequency of inhibitory genes such as KIR2DL2, KIR2DL3, and KIR3DL1 in the control group, which supports the idea of a protective factor against the disease in this group. Conversely, the activating KIR3DS1 and KIR2DS2 genes had higher frequencies in the patient group, indicating a risk for the disease [48]. These findings are complementary because an increase expression of inhibitory genes is expected in the healthy group whereas an increased expression of activating genes is expected in patients. Nevertheless, we could not find relevant data related to the activating KIR2DS1 gene in the Indian study that could be compared with our findings.

In conclusion, several studies have been conducted with the purpose of understanding the role of NK cells and the interaction between KIR genes and class I HLA molecules in both autoimmune and non-autoimmune diseases. Notably, data reported in the present study adds vitiligo to the list of human disorders in which a potential involvement of the KIR system could be considered. Our study is the first to describe a potential susceptibility to vitiligo based on the prevalence of the KIR2DS1

gene and its C2 ligand. Further studies should be conducted to confirm our findings and better understand this mechanism and other possible interactions.

CONFLITS OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

REFERENCES

- [1] Alikhan A, Felsten LM, Daly M, and Petronic-Rosic V. Vitiligo: A Comprehensive Overview Part I. Introduction, Epidemiology, Quality of Life, Diagnosis, Differential Diagnosis, Associations, Histopathology, Etiology, and Work-Up. *J Am Acad Dermatol* 2011; 65(3): 473-91.
- [2] Lerner AB, Nordlund JJ. Vitiligo. What Is It? Is It Important? *JAMA* 1978; 239: 1183-7.
- [3] Lotti T, and D'Erme AM. Vitiligo as a Systemic Disease. *Clin Dermatol* 2014; 32(3): 430-4.
- [4] Steiner D, Bedin V, Moraes M, Villas R. & Steiner T. Vitiligo*. *An Bras Dermatol Rio de Janeiro* 2004; 79(3): 335-351.
- [5] Barnes L. Vitiligo and the Vogt-Koyanagi-Harada Syndrome. *Dermatol Clin* 1988; 6 (2): 229-39.
- [6] Pawelek J, Körner A, Bergstrom A, and Bologna J. New Regulators of Melanin Biosynthesis and the Autodestruction of Melanoma Cells. *Nature* 1980; 286 (5773): 617-9.
- [7] Kemp EH, Gavalas NG, Gawkrödger DJ, Weetman AP. Autoantibody Responses to Melanocytes in the Depigmenting Skin Disease Vitiligo. *Autoimmun Rev* 2007; 6(3): 138-42.

- [8] Kemp EH, Waterman EA, Weetman AP. Autoimmune Aspects of Vitiligo. *Autoimmunity* 2001; 34(1): 65-77.
- [9] Mozzanica N, Villa ML, Foppa S, Vignati G, Cattaneo A, Diotti A, Finzi AF. Plasma Alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone, Beta-Endorphin, Met-Enkephalin, and Natural Killer Cell Activity in Vitiligo. *J Am Acad Dermatol* 1992; 26(5) Pt 1: 693-700.
- [10] Parham P. Influence of KIR Diversity on Human Immunity. *Adv Exp Med Biol* 2005; 560: 47-50.
- [11] Jobim M, and Jobim LF. Natural Killer Cells and Immune Surveillance. *J Pediatr (Rio J)* 2008; 84(4): S58-67.
- [12] Jobim MR, Jobim M, Salim, PH, Portela, P, Jobim, LF, et al. Analysis of KIR gene frequencies and HLA class I genotypes in breast cancer and control group. *Human Immunology* 2013; 74: 1130-1133.
- [13] Vilches C, and Parham P. KIR: Diverse, Rapidly Evolving Receptors of Innate and Adaptive Immunity. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 217-51.
- [14] Borrego F, Kabat J, Kim DK, Lieto L, Maasho K, Peña J, Solana R, and Coligan JE. Structure and Function of Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I Specific Receptors Expressed on Human Natural Killer (NK) Cells. *Mol Immunol* 2002; 38(9): 637-60.
- [15] Parham P. Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor Diversity: Balancing Signals in the Natural Killer Cell Response. *Immunol Lett* 2004; 92(1-2): 11-3.
- [16] Boyton RJ, and Altmann DM. Natural Killer Cells, Killer Immunoglobulin-Like Receptors and Human Leucocyte Antigen Class I in Disease. *Clin Exp Immunol* 2007; 149(1): 1-8.
- [17] Marsh SG, Parham P, Dupont B, Geraghty DE, Trowsdale J, Middleton D, Vilches C, Carrington M, Witt C, Guethlein LA, Shilling H, Garcia CA, Hsu KC, and Wain H. Killer-Cell Immunoglobulin-Like Receptor (KIR) Nomenclature Report, 2002. *Tissue Antigens* 2003; 62(1): 79-86.
- [18] Uhrberg M. Shaping the Human NK Cell Repertoire: An Epigenetic Glance at KIR Gene Regulation. *Mol Immunol* 2005; 42(4): 471-5.
- [19] Parham P. MHC Class I Molecules and KIRs in Human History, Health and Survival. *Nat Rev Immunol* 2005; 5(3): 201-14.

- [20] Wilson MJ, Torkar M, Haude A, Milne S, Jones T, Sheer D, Beck S, and Trowsdale J. Plasticity in the Organization and Sequences of Human KIR/ILT Gene Families. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(9): 4778-83.
- [21] André P, Biassoni R, Colonna M, Cosman D, Lanier LL, Long EO, Lopez-Botet M, Moretta A, Moretta L, Parham P, Trowsdale J, Vivier E, Wagtmann N, and Wilson MJ. New Nomenclature for MHC Receptors. *Nat Immunol* 2001; 2(8): 661.
- [22] Winter CC, Long EO. A single amino acid in the p58 killer cell inhibitory receptor controls the ability of natural killer cells to discriminate between the two groups of HLA-C allotypes. *J Immunol*, 1997; 158: 4026-8.
- [23] Biassoni R, Falco M, Cambiaggi A, Costa P, Verdiani S, Pende D, Conte R, Di Donato C, Parham P, and Moretta L. Amino Acid Substitutions Can Influence the Natural Killer (NK)-Mediated Recognition of HLA-C Molecules. Role of Serine-77 and Lysine-80 in the Target Cell Protection from Lysis Mediated By "Group 2" Or "Group 1" NK Clones. *J Exp Med* 1995; 182(2): 605-9.
- [24] Long BR, Ndhlovu LC, Oksenberg JR, Lanier LL, Hecht FM, Nixon DF, and Barbour JD. Conferral of Enhanced Natural Killer Cell Function by KIR3DS1 in Early Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J Virol* 2008; 82(10): 4785-92.
- [25] Cella M, Longo A, Ferrara GB, Strominger JL, and Colonna M. NK3-Specific Natural Killer Cells Are Selectively Inhibited by Bw4-Positive HLA Alleles with Isoleucine 80. *J Exp Med* 1994; 180(4): 1235-42.
- [26] De Vijlder HC, Westerhof W et al. Difference in pathogenesis between vitiligo vulgaris and halo nevi associated with vitiligo is supported by an HLA association study. *Pigment cell*. 2004; 17: 270-274.
- [27] Portela P, Jobim LF, Salim PH, Koff WJ, Wilson TJ, Jobim MR, Schwartzmann G, Roesler R, Jobim M. Analysis of KIR gene frequencies and HLA class I genotypes in prostate cancer and control group. *Int J Immunogenet*. 2012 39(5):423-8.

- [28] Jobim M, Chagastelles P, Salim PH, Portela P, Wilson TJ, Curti AG, Jobim MR, João DA, Nardi NB, Tschiedel B, Jobim LF, Roesler R, Schwartzmann G. Association of killer cell immunoglobulin-like receptors and human leukocyte antigen-C genotypes in South Brazilian with type 1 diabetes. *Hum Immunol*. 2010 71(8):799-803.
- [29] Wilson TJ, Jobim M, Jobim LF, Portela P, Salim PH, Rosito MA, Damin DC, Flores C, Peres A, Machado MB, Chies JA, Schwartzmann G, Roesler R. Study of killer immunoglobulin-like receptor genes and human leukocyte antigens class I ligands in a Caucasian Brazilian population with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Hum Immunol*. 2010; 71(3):293-7.
- [30] Miller SA, Dykes DD, and Polesky HF. A Simple Salting out Procedure for Extracting DNA from Human Nucleated Cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(3):1215.
- [31] Jones DC, Edgar RS, Ahmad T, Cummings JR, Jewell DP, Trowsdale J, and Young NT. Killer Ig-Like Receptor (KIR) Genotype and HLA Ligand Combinations in Ulcerative Colitis Susceptibility. *Genes Immun* 2006; 7(7): 576-82.
- [32] Bunce M, O'Neill CM, Barnardo MC, Krausa P, Browning MJ, Morris PJ, and Welsh KI. Phototyping: Comprehensive DNA Typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 Primer Mixes Utilizing Sequence-Specific Primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens* 1995; 46(5): 355-67.
- [33] Basak PY, Adiloglu AK, Koc IG, Tas T, and Akkaya VB. Evaluation of Activatory and Inhibitory Natural Killer Cell Receptors in Non-Segmental Vitiligo: A Flow Cytometric Study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2008; 22(8): 970-6.
- [34] Foley LM, Lowe NJ, Misheloff E, and Tiwari JL. Association of HLA-DR4 with Vitiligo. *J Am Acad Dermatol* 1983; 8(1): 39-40.
- [35] Frati R, Frati C, Sassano PP, Antonaci A. Vitiligo, autoimmune thyroiditis: a rare thyroid cancer arising with bone metastases on maxillofacial area. *J Exp Clin Cancer Res* 1999; 18:85-87.
- [36] Handa S, Kaur I. Vitiligo: clinical findings in 1436 patients. *J Dermatol*. 1999; 26: 653-657.

- [37] Kakourou T, Kanaka-Gantebein C, Papadopoulou A, Kaloumenou E, Chrousos GP. Increased prevalence of chronic autoimmune (Hashimoto`s) thyroiditis in children and adolescents with vitiligo. *J. Am Acad Dermatol* 2005; 53: 220-223.
- [38] Jobim M, Jobim LF, Salim P, Cestari T, et al. A study of the killer cell immunoglobulin-like receptor gene KIR2DS1 in a caucasoid Brazilian population with psoriasis vulgaris. *Tissue Antigens* 2008; 72: 392-396.
- [39] Suzuki Y, Hamamoto Y, Ogasawara Y et al. Genetic polymorphisms of killer cell immunoglobulin-like receptors are associated with susceptibility to psoriasis vulgaris. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 1133-6.
- [40] Luszczek W, Manczak M, Cisto M et al. Gene for the activating natural killer cell receptor, KIR2DS1, is associated with susceptibility to psoriasis vulgaris. *Hum Immunol* 2004; 65: 758-66.
- [41] Chang YT, Chou CT, Shiao YM, et al. The killer cell immunoglobulin-like receptor genes do not confer susceptibility to psoriasis vulgaris independently in Chinese. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 2335-8.
- [42] Momot T, Koch S, Hunzelmann N, et al. Association of killer cell immunoglobulin-like receptors with scleroderma. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 1561-5.
- [43] Pellett F, Siannis F, Vukin I, Lee P, Urowitz MB, Glandman DD. KIRs and autoimmune diseases: studies in systemic lupus erythematosus and scleroderma. *Tissue Antigens* 2007; 69: 106-8.
- [44] Kimoto Y, Horiuchi T, Tsukamoto H, et al. Association of killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL5 with systemic lupus erythematosus and accompanying infections. *Rheumatology* 2010; 49: 1346-1353.
- [45] Pedroza L, Sauma M, Vasconcelos JM, Takeshita LY, Ribeiro-Rodrigues EM, Sastre D, et al. Systemic Lupus Erythematosus: Association with KIR and SLC11A1 polymorphisms, ethnic predisposition and influence in clinical manifestations at onset revealed by ancestry genetic markers in an urban Brazilian population. *Lupus* 2011; 20(3): 265-73.
- [46] Salim P, Jobim M, Bredemeier M, Chies JAB, et al. Killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genes in systemic sclerosis. *Clinical & Experimental Immunology* 2010; 160: 325-330.

- [47] Majorczyk E, Pawlik A, Luszczek W, et al. Associations of killer cell immunoglobulin-like receptor genes with complications of rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 2007; 8: 678-83.
- [48] Prakash S, Alam S, Bharadwaj U, et al. Associations of killer cell immunoglobulin like receptors with rheumatoid arthritis among North Indian population. *Human Immunology* 2014; 75 (8): 802-7.

Table 1. KIR gene frequencies (%) in controls (n=250) and **vitiligo patients** (112).

KIR gene	Controls		Patients		P-value*
	N	%	N	%	
2DL1	244	97.6	106	94.6	NS
2DL2	136	54.4	55	49.1	NS
2DL3	216	86.4	103	92.0	NS
2DL4	250	100.0	112	100.0	NS
2DL5	124	49.6	58	51.8	NS
3DL1	244	97.6	104	92.9	NS
3DL2	250	100.0	112	100.0	NS
3DL3	250	100.0	112	100.0	NS
2DS1	91	36.4	50	44.6	NS
2DS2	134	53.6	57	50.9	NS
2DS3	83	33.2	28	25.0	NS
2DS4	238	95.2	104	92.9	NS
2DS5	85	34.0	41	36.6	NS
2DP1	250	100.0	108	96.4	NS
3DS1	106	42.4	46	41.1	NS

*Chi-Square Test or Fischer's Exact Test with Bonferroni correction; NS = Not Significant

Table 2. Frequencies of KIR ligands in controls (n=250) and vitiligo patients (112).

KIR ligands	Controls		Patients		P-value*	OR	95%CI
	N	%	N	%			
A3	55	22.0	13	11.6	NS		
A11	32	12.8	8	7.1	NS		
Bw4	171	68.4	54	48.2	<0.001	0.43	0.27-0.70
C1	180	72.0	92	82.1	NS		
C2	179	71.6	72	64.3	NS		
C1/C1	71	28.4	39	34.8	NS		
C1/C2	109	43.6	54	47.3	NS		
C2/C2	70	28.0	19	17.0	NS		

*Chi-Square Test or Fischer's Exact Test with Bonferroni correction; NS = Not Significant

C1 group: HLA-Cw 01, 03, 07 (01-06), 08, 12 (02, 03, 06), 14, 16 (01, 03, 04)

C2 group: HLA-Cw 02, 04, 05, 06, 0707, 12 (04, 05), 15, 1602, 17, 18

Bw4: HLA-B 08, 13, 27, 44, 51, 52, 53, 57, 58

OR: Odds ratio. Confidence Intervals

Table 3. Inhibitory KIR gene frequencies in the presence and absence of their ligands in controls (250) and vitiligo patients (112).

	Controls		Patients		P-value*
	n	(%)	n	(%)	
2DL1+ C2+	176	(98.3)	68	(94.4)	NS
2DL1+ C2-	68	(95.8)	37	(94.9)	NS
2DL1+ C2/C2	68	(97.1)	18	(94.7)	NS
2DL2+ C1+	102	(56.7)	49	(53.3)	NS
2DL2+ C1-	34	(48.6)	6	(31.6)	NS
2DL2+ C1/C1	40	(56.3)	19	(48.7)	NS
2DL2+ C1/C2	62	(56.9)	30	(56.6)	NS
2DL3+ C1+	153	(85.0)	84	(91.3)	NS
2DL3+ C1-	63	(90.0)	18	(94.7)	NS
2DL3+ C1/C1	58	(81.7)	35	(89.7)	NS
2DL3+ C1/C1	95	(87.2)	49	(92.5)	NS
3DL1+ Bw4+	166	(97.1)	50	(92.6)	NS
3DL1+ Bw4-	78	(98.7)	54	(93.1)	NS

*Chi-Square Test with continuity correction; NS = Not Significant

C1 group: HLA-Cw 01, 03, 07 (01-06), 08, 12 (02, 03, 06), 14, 16 (01, 03, 04)

C2 group: HLA-Cw 02, 04, 05, 06, 0707, 12 (04, 05), 15, 1602, 17, 18

Bw4: HLA-B 08, 13, 27, 44, 51, 52, 53, 57, 58

Table 4. Activating KIR gene frequencies in the presence and absence of their ligands in controls (250) and vitiligo patients (112).

	Controls		Patients		P-value*
	n	(%)	n	(%)	
2DS2+ C1+	100	(55.6)	51	(55.4)	NS
2DS2+ C1-	34	(48.6)	6	(31.6)	NS
2DS2+ C1/C1	71	(56.3)	21	(53.8)	NS
2DS2+ C1/C2	60	(55.0)	30	(56.6)	NS
2DS1+ C2+	63	(35.2)	38	(52.8)	0.015**
2DS1+ C2-	28	(39.4)	12	(30.8)	NS
2DS1+ C2/C2	25	(35.7)	9	(47.4)	NS
2DS1 + C1 / C2	38	(34.9)	29	(54.7)	0.025***
3DS1+ Bw4+	67	(39.2)	27	(50.0)	NS
3DS1+ Bw4-	39	(49.4)	19	(32.8)	NS

*Chi-Square Test with continuity correction; NS = Not Significant

C1 group: HLA-Cw 01, 03, 07 (01-06), 08, 12 (02, 03, 06), 14, 16 (01, 03, 04)

C2 group: HLA-Cw 02, 04, 05, 06, 0707, 12 (04, 05), 15, 1602, 17, 18

Bw4: HLA-B 08, 13, 27, 44, 51, 52, 53, 57, 58

**OR: 2.06; 95%CI: 1.14-3.72

***OR: 2.26; 95%CI: 1.10-4.66

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O vitiligo é uma doença dermatológica a qual ocorre despigmentação natural da pele devido à redução no número e na função dos melanócitos. Não há diferenciação entre faixa etária, raça e sexo. Acredita-se que esta patologia tenha etiologia autoimune, visto que há estudos que associam o aparecimento do vitiligo a outras doenças autoimunes. Há registros da presença de autoanticorpos antimelanocíticos que auxiliam na destruição das células melanocíticas.

As células *natural killer* (NK) fazem parte da imunidade inata, participantes da vigilância imunológica possuem ampla habilidade em reconhecer e combater células infectadas por vírus e células tumorais. Em sua superfície existem receptores que representam genes KIR e eles se ligam às moléculas de HLA de classe I presentes na superfície da célula-alvo. Ao reconhecer uma célula como própria, as NK são inibidas e evitam a lise da célula-alvo, contudo, se não houver este reconhecimento, as células NK são ativadas e induzidas a lisar a célula-alvo. Deste modo, conhecer

os polimorfismos na interação KIR/HLA é de suma importância para compreender diversas patologias, entre elas o vitiligo.

No presente estudo, o objetivo foi investigar os polimorfismos dos genes KIR associados ao sistema HLA em pacientes com vitiligo e comparados a um grupo controle. Foram genotipados 112 pacientes com a patologia em questão e 250 pessoas saudáveis para os genes KIR e HLA de classe I através dos métodos PCR-SSO e PCR-SSP.

Ao compararmos os grupos, encontramos diferenças significativas no gene ativador KIR2DS1 associado com seu ligante C2, e também com os ligantes C1/C2 (heterozigose). Nossos resultados apontam para uma possível suscetibilidade ao vitiligo, sendo o primeiro estudo a constatar tal fato. No entanto, mais estudos nesta área com diferentes populações são necessárias a fim de encontrar novas interações entre genes KIR e moléculas de HLA de classe I.

APÊNDICE

A. Pesquisa

Protocolo de

Projeto: **Análise do polimorfismo dos genes KIR e HLA em pacientes com vitiligo.**

Nome do Paciente: _____

Número do paciente: _____ **Número do prontuário:** _____

Raça: Euro-descendente Afro-descendente

Sexo: Feminino Masculino

Data de nascimento: ____/____/____ **Idade:** ____ anos

Tipo de Vitiligo:

Localizado

- Focal
- Segmentar
- Generalizado**
 - Acrofacial
 - Vulgar
 - Mista
- Universal**

Doenças co-relacionadas:

- Alterações genéticas**
 - Qual? _____
- Doenças inflamatórias**
 - Qual? _____
- Doenças malignas (ex: micose fúngica)**
 - Qual? _____
- Doenças infecciosas (ex: pitíriase, sífilis, hanseníase)**
 - Qual? _____
- Desordens idiopáticas**
 - Qual? _____
- Nevo halo**
- Nenhuma doença co-relacionada**

Forma de tratamento:

- Esteróides**
 - Qual? _____
- PUVA**
 - Terapia Oral
 - Terapia Tópica
 - Terapia Combinada
- Terapia Cirúrgica**
- Micropigmentação**
- Imunomoduladores**
 - Qual? _____
- Despigmentação**
- Outras terapias:**
 - Pseudocatalase
 - Helioterapia
 - UVB
 - Extrato de placenta humana
 - Kellin (KUVA)
 - Fenilalanina tópica e sistêmica

- Antioxidantes
- Outra: _____
- Nenhum tratamento**

Observações: _____

Tipagem HLA C1: _____

Tipagem HLA C2: _____

Tipagem HLA Bw4: _____

Tipagem HLA A3: _____

Tipagem HLA A11: _____

Tipagem KIR: _____

**B. Termo de
Consentimento Livre e Esclarecido – Pacientes**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

CASOS

PROJETO

Análise de polimorfismos dos genes KIR e HLA em pacientes com vitiligo e grupo controle.

POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO?

Vitiligo é uma doença não contagiosa em que ocorre a perda da pigmentação natural da pele. Sua etiologia ainda não é bem compreendida, embora o fator autoimune pareça ser importante. Contudo, estresse físico, emocional, e ansiedade são fatores comuns no desencadeamento ou agravamento da doença. Patologicamente, o vitiligo se caracteriza pela redução no número ou função dos

melanócitos, células localizadas na epiderme responsáveis pela produção do pigmento cutâneo — a melanina.

Este estudo está sendo realizado para investigar os diversos tipos de genes KIR e HLA em população controle e em grupo de pacientes com vitiligo.

DE QUE CONSTA O ESTUDO?

Ele consta de um exame de sangue, que será utilizado para a análise dos genes relacionados com o vitiligo. O uso dessa parte do sangue para quaisquer outras finalidades é vetado.

QUAIS SÃO AS VANTAGENS EM PARTICIPAR DO ESTUDO?

Colaborar para o avanço e progresso do conhecimento sobre o vitiligo relacionado aos diversos tipos de genes KIR e HLA.

QUAIS SÃO AS COMPLICAÇÕES EM PARTICIPAR DO ESTUDO?

Realizar punção venosa para coleta de sangue, podendo causar dor temporária e hematoma.

HÁ A POSSIBILIDADE DESTE ESTUDO CONTINUAR?

Este estudo foi planejado para encerrar em 2014, e para avaliar o risco genético apenas através dos genes KIR e HLA. No entanto é possível que mais genes relacionados com vitiligo possam vir a ser analisados mais adiante.

DADOS RELATIVOS À PROTEÇÃO DO PACIENTE

- Os dados coletados neste estudo são confidenciais, e não serão revelados dados que permitam identificar os pacientes em hipótese alguma.
- A adesão ao estudo é voluntária, ou seja, cada paciente é livre para decidir de não participar.
- A decisão de não participar não interferirá no acompanhamento normal dos pacientes no Ambulatório, na Emergência e na Internação do Hospital de Clínicas.
- O paciente é livre para desistir em qualquer momento do estudo, sem necessidade de fornecer justificativa.

COMPREENSÃO E AUTORIZAÇÃO

Tendo compreendido as informações do presente termo de consentimento e concordado com elas, assinala um X apenas uma das opções abaixo:

() Autorizo o uso dos dados da amostra de sangue para a análise dos diversos tipos de genes KIR e HLA relacionados ao vitiligo.

() Autorizo o uso dos dados da amostra de sangue para a análise dos diversos tipos de genes KIR e HLA relacionados ao vitiligo, bem como o armazenamento da amostra de sangue para análise destes genes e de outros genes relacionados ao vitiligo que possam vir a ser considerados relevantes dentro desta linha de pesquisa, desde que pelo mesmo grupo de pesquisa. Será requisitada nova autorização dos pacientes no contexto de um novo projeto, bem como sua aprovação junto ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HCPA e do Comitê Nacional de Ética em Pesquisa. Caso haja impossibilidade de obtenção de nova autorização, esta situação será avaliada pelo CEP.

() Autorizo o uso dos dados da amostra de sangue para a análise dos diversos tipos de genes KIR e HLA relacionados ao vitiligo, bem como o emprego da amostra de sangue coletada na ocasião de outro projeto para análise dos genes.

Paciente: _____

Registro: _____ Assinatura: _____

Pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Porto Alegre, _____ de _____ de 20__.

Pesquisadores responsáveis:

Dra. Mariana Jobim

Dr. Luiz Fernando Jobim

Telefone: (51) 3359-8020

**C. Termo de
Consentimento Livre e Esclarecido – Controles**

REGISTRO BRASILEIRO DE DOADORES VOLUNTARIOS

DE MEDULA OSSEA – REDOME

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____,
abaixo assinado(a) e acima qualificado(a), pelo presente instrumento CONSENTO
que os meus dados cadastrais, o resultado de minha tipificação HLA e os outros
resultados dos exames de histocompatibilidade / Imunogenética sejam incluídos no
REGISTRO BRASILEIRO DE DOADORES VOLUNTÁRIOS DE MEDULA OSSEA -
REDOME, coordenado pelo Laboratório de Imunogenética do Instituto Nacional de

Câncer — INCA, do Ministério da Saúde. A amostra coletada nesta ocasião poderá ser utilizada em possíveis testes genéticos futuros, desde que de maneira sigilosa.

Nesta data recebi as orientações sobre o que é o transplante de medula óssea e o transplante de células precursoras e estou ciente de que:

O candidato a doador de medula óssea e/ou tecidos hematopoéticos deve encontrar-se em bom estado de saúde.

Na oportunidade de ser selecionado, o doador deverá passar por exames clínicos e laboratoriais que atestem a inexistência de doença, especialmente as infectocontagiosas.

Na oportunidade de ser selecionado para doação de medula óssea, o doador passará por internação hospitalar (hospital/dia) sendo necessário submeter-se a procedimento sob anestesia geral para retirada de não mais que 10% de sua medula óssea. O procedimento consiste em punção glútea (4 a 8 punções). A medula óssea do doador é espontaneamente restaurada em poucas semanas.

Na oportunidade de ser selecionado para doação de precursores hematopoéticos, após utilizar por via subcutânea uma medicação estimulante de células hematopoiéticas, o doador será submetido a procedimento semelhante a doação de sangue sendo este realizado em caráter ambulatorial, não sendo para isso necessários os procedimentos mencionados no segundo item deste termo.

Os riscos para doadores de medula óssea e/ou tecidos hematopoéticos é praticamente inexistente. Nos casos de doação de medula óssea, devido ao procedimento de punção, é comum haver queixa de discreta dor no local da punção.

Tenho, também ciência do propósito a que se destina o referido Registro e meu cadastramento nele.

Proponho-me, assim, a ser um eventual doador de medula óssea ou de células precursoras, sabendo que me é reservado o direito de decisão final para doação, mantendo-se a condição de sigilo acima especificada.

Porto Alegre, ____/____/____

Nome Legível

Assinatura

Testemunhas:

Nome legível: _____ Assinatura: _____

Nome legível: _____ Assinatura: _____